

Molekulare Analyse der sexuellen Kommunikation des Zygomyceten *Mucor mucedo*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Diplom – Biologin
Yvonne Rudigier

geboren am 11.01.1980 in Offenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer, Friedrich Schiller – Universität Jena
2. Prof. Dr. Günther Theißen, Friedrich Schiller – Universität Jena
3. Prof. Dr. Paul Galland, Philipps – Universität Marburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.06.2013

All we have to decide is what to do with the time that is given to us.”

J.R.R.Tolkien: The Lord of the Rings, The Fellowship of the Ring

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungen	vii
1 Einleitung	1
1.1 Sexuelle Kommunikation bei Pilzen	1
1.2 Lebenszyklus der Zygomyceten	2
1.3 Sexuelle Kommunikation bei Zygomyceten	4
1.4 Zellwand-assoziierte Proteine	6
1.4.1 Zell-Zell-Erkennung bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.5 Ziel der Arbeit	8
2. Material	10
2.1 Chemikalien	10
2.2 Stämme	12
2.3 Kulturmedien	12
2.4 Puffer und Lösungen	13
2.4.1 IEF	13
2.4.2 2D – Gelelektrophorese	14
2.4.3 DNA – Extraktion	14
2.4.4 Agarosegele	15
2.4.5 Isolierung der Zellwandproteine	15
2.4.6 Gene Clean	15
2.4.7 Zellwandfärbung	16
2.4.8 Allgemeine Lösungen	16
2.5 Primersequenzen	16
2.5.1 Degenerierte Primer	16
2.5.2 RAPD Primer	17
2.6 Klonierung	17
2.6.1 Vektor	17
2.6.2 Puffer, Enzyme	19
3 Methoden	20
3.1 Kultivierung	20
3.1.1 Anzucht zur Proteinisolierung	20
3.1.1.1 TA – Induktion	20
3.1.2 Anzucht zur DNA – Isolierung	20

3.1.3 Extraktion von Trisporoiden aus <i>Blakeslea trispora</i> Flüssigkulturen	21
3.2 Proteinisolierung (zytosolisch)	21
3.3 Proteinisolierung (Zellwand – assoziierte Proteine)	22
3.4 Proteinfällung	22
3.5 Konzentrationsbestimmung der Proteinproben	22
3.6 Rehydrierung der IEF – Streifen	23
3.7 Fokussierung der IEF – Streifen	23
3.8 Äquilibration der IEF – Streifen	23
3.9 Elektrophorese der 2D – Gele	23
3.10 In-Gel-Verdau	24
3.11 MS – Analyse	24
3.12 DNA – Isolierung	25
3.12.1 Konzentrationsbestimmung der DNA	25
3.13 PCR – Durchführung	26
3.14 Isolierung der PCR – Fragmente aus dem Agarosegel	26
3.15 Restriktionsverdau	27
3.16 Ligation	27
3.17 Transformation	27
3.18 Plasmidpräparation	27
3.19 Kompetente Zellen	28
3.20 Zellwandfärbung mit Calcofluor white (CFW) und ConcanavalinA (ConA)	28
3.21 Zellwandfärbung mit Eosin Y und CFW	29
3.22 Probenaufbereitung für HPLC	29
3.22.1 Zellwandextraktion	29
3.22.2 Saure Hydrolyse	30
3.22.3 HPLC – Analyse	30
4. Ergebnisse	31
4.1 2D – Gelelektrophorese	31
4.1.1 Zellwand – assoziierte Proteine	31
4.1.2 Zytoplasmatische Proteine	33
4.1.2.1 Zytoplasmatische Proteine	36
4.2 Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteine	37
4.3 Weitere Analysen der einzelnen Proteinspots	41

4.3.1 z1: Zink – Finger, FYVE – Familie	41
4.3.1.1 Konstruktion der Primer	42
4.3.2 2 Zellw: Leucine-rich repeat	43
4.3.2.1 Konstruktion der Primer	43
4.3.3 3 Zellw: hypothetical protein	44
4.3.3.1 Konstruktion der Primer	44
4.3.4 z3. hypothetical protein	45
4.3.4.1 Konstruktion der Primer	46
4.3.4.2 Amplifikation des DNA- Fragments z3	46
4.3.5 4 Zellw: hypothetical protein	48
4.3.5.1 Konstruktion der Primer	48
4.3.6 5 Zellw: no name given	49
4.3.6.1 Konstruktion der Primer	49
4.3.7 6 Zellw: Zn-finger	50
4.3.7.1 Konstruktion der Primer	50
4.3.8 z8: G-protein beta WD-40 repeat	51
4.3.8.1 Konstruktion der Primer	51
4.3.8.2 Amplifikation des DNA- Fragments z8	52
4.3.9 9 Zellw: predicted protein	54
4.3.9.1 Konstruktion der Primer	54
4.3.10 z9: hypothetical protein	55
4.3.10.1 Konstruktion der Primer	55
4.3.10.2 Amplifikation des DNA- Fragments z9	56
4.3.10.3 Sequenz des z9(-)7 – Fragments	57
4.3.11 10 Zellw: transposon protein, putative	58
4.3.11.1 Konstruktion der Primer	58
4.3.12 z10: hypothetical protein/riboflavin aldehyd-forming enzyme	59
4.3.12.1 Konstruktion der Primer	59
4.3.13 11 Zellw: hypothetical protein	59
4.3.13.1 Konstruktion der Primer	59
4.3.13.2 Amplifikation des DNA- Fragments 11 Zellw	61
4.3.14 d3: signalosome complex subunit/JUN kinase	61
4.3.14.1 Konstruktion der Primer	62

4.3.14.2 Amplifikation des DNA- Fragments d3	62
4.3.14.3 Sequenz des d3(+) ¹ – Fragments	63
4.3.15 d5: hypothetical protein	64
4.3.15.1 Konstruktion der Primer	64
4.3.15.2 Amplifikation des DNA- Fragments d5	65
4.3.16 d6: predicted protein	66
4.3.16.1 Konstruktion der Primer	66
4.3.16.2 Amplifikation des DNA- Fragments d6	67
4.3.17 d7: hypothetical protein	67
4.3.17.1 Konstruktion der Primer	67
4.3.17.2 Amplifikation des DNA- Fragments d7	68
4.3.17.3 Sequenz des d7(-) ⁴ – Fragments	70
4.3.18 d9 predicted protein	70
4.3.18.1 Proteinsequenz von d9	70
4.3.19 d10: stomatin	70
4.3.19.1 Konstruktion der Primer	71
4.3.19.2 Amplifikation des DNA- Fragments d10	71
4.3.19.3 Sequenz des d10(+) ¹ – Fragments	73
4.3.20 A2: Malatdehydrogenase	73
4.3.20.1 Konstruktion der Primer	74
4.3.20.2 Amplifikation des DNA- Fragments A2	74
4.3.20.3 Sequenz des A2(-) ¹ – Fragments	76
4.3.21 A3: Malatdehydrogenase	76
4.3.21.1 Konstruktion der Primer	76
4.3.21.2 Amplifikation des DNA- Fragments A3	77
4.3.21.3 Sequenz des A3(+) ¹ – Fragments	79
4.3.22 A4: Acyl-CoA Dehydrogenase	79
4.3.22.1 Konstruktion der Primer	79
4.3.22.2 Amplifikation des DNA- Fragments A4	80
4.3.22.3 Sequenz des A4(-) ⁵ – Fragments	82
4.3.23 A7: S-adenosylmethionine synthetase	82
4.3.23.1 Konstruktion der Primer	82
4.3.23.2 Amplifikation des DNA- Fragments A7	82

4.3.23.3 Sequenzen der Klone A7(-)15, A7(-)16, A7(+)15 und A7(+) 18	84
4.4 Sequenzvergleiche mit Dikarya und Mucoromycotina	85
4.4.1 Sequenzvergleich von z9	85
4.4.2 Sequenzvergleich von d3	85
4.4.3 Sequenzvergleich von d7	86
4.4.4 Sequenzvergleich von d10	86
4.4.5 Sequenzvergleich von A2	87
4.4.6 Sequenzvergleich von A3	88
4.4.7 Sequenzvergleich von A4	89
4.5 Random Amplified Polymorphic DNA – PCR (RAPD-PCR)	90
4.6 Zellwandglykosylierung von <i>Mucor mucedo</i>	92
4.6.1 HPLC	92
4.6.2 Zellwandfärbungen	93
4.6.2.1 Mannosenachweis	93
4.6.2.2 Glukosefärbungen	95
4.6.2.3 Chitosanfärbungen	95
5 Diskussion	98
5.1 2D – Gele	98
5.1.1 Zellwand-assoziierte Proteine	98
5.1.2 Zytoplasmatische Proteine	101
5.2 Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)	102
5.3 “A2” und “A3”: Malatdehydrogenase	102
5.4 “A4”: Acyl-CoA Dehydrogenase	104
5.5 “A7”: S-Adenosylmethionin Synthetase	105
5.6 RAPD-PCR von <i>Mucor mucedo</i> und <i>Absidia glauca</i>	107
5.7 DNA- Sequenzvergleiche mit Dikarya und Mucoromycotina	109
5.8 Chitosanbildung während der Zygosporientstehung	110
6 Zusammenfassung	112
7 Abstract	113
8 Literatur	114
9 Danksagung	125
10 Veröffentlichungen	126
10.1. Vortrag	126

Inhaltsverzeichnis

10.2 Poster	126
11 Curriculum vitae	127
11.1 Persönliche Angaben	127
12 Selbständigkeitserklärung	128

Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
AGA	α -Agglutinin Structural Gene
APS	Adenosin 5`Phosphosulfat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
CFW	Calcofluor white
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate
ConA	ConcanavalinA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
IEF	Isoelectric focusing
IM	Induktionsmedium
LB-MEDIUM	Lysogeny broth Medium
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time of Flight
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasechainreaction
PMF	Peptidmassenfingerabdruck
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SUP	Supplementiertes Minimalmedium
spp.	species pluralis
TA	Trisporic acid
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N`N` - Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid
UDP	Uridine diphosphate

1 Einleitung

1.1 Sexuelle Kommunikation bei Pilzen

Pilze hängen von spezifischen interzellulären Kommunikationssystemen ab, um sexuelle Interaktionen durchzuführen. Kleine diffundierende Moleküle sind notwendig für die Partnererkennung. Dies beinhaltet Unterscheidung zwischen der eigenen und fremden Arten und verlässliche Erkennung des komplementären Kreuzungspartners. Diese Signale müssen während den entsprechenden Entwicklungsstadien gesendet, empfangen und von anderen Umgebungssignalen unterschieden werden. Daraufhin müssen sie interpretiert und schließlich für die Initiation des eigenen Entwicklungsprogrammes genutzt werden (Schimek & Wöstemeyer, 2006).

Sex bei Pilzen beinhaltet drei Schritte: Zwei kompatible Kreuzungspartner erkennen sich gegenseitig und durchlaufen eine Zellfusion (Plasmogamie). Danach findet bei zwei parenteralen Nuclei eine Kernfusion (Karyogamie) statt. Karyogamie findet bei den Chytridiomyceten, Zygomyceten und einem Teil der Ascomyceten sofort nach der Plasmogamie statt, bei einem weiteren Teil der Ascomyceten und den Basidiomyceten ist die Karyogamie jedoch verzögert. In diesen Fällen besteht ein dikaryotes Stadium mit zwei Zellkernen auch nach der Zellfusion. Besonders ausgeprägt ist dies in den Basidiomyceten, die stabile dikaryote Hyphen während ihres Wachstums haben. Erst zu einem späteren Zeitpunkt fusionieren beide Zellkerne und der dritte Schritt, die Meiose, findet statt, um haploide, rekombinante Nachkommen zu erzeugen (Alexopoulos, 1962).

Die sexuellen Prozesse unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Phyla erheblich. Bei den Ascomyceten sind die sexuellen Sporen (Ascosporen) in einem Ascus eingeschlossen. Diese Asci beinhalten, je nach Art, vier oder acht Ascosporen. *Saccharomyces cerevisiae*, ein Hemiascomycet, produziert einen Ascus mit vier haploiden Ascosporen. Die Paarung bei *S. cerevisiae* und anderen Ascomyceten wird durch Transkriptionsfaktoren des *MAT* Locus reguliert (Jones et al., 2011). Haploide Zellen, die über den *MAT_a* Locus verfügen, werden als **a** Zellen klassifiziert, sie können sich mit α Zellen paaren, die den *MAT α* Locus exprimieren (Heitman, 2007). Es gibt zwei haploide Zelltypen, **a** und α , wobei jeder Zelltyp ein differenziertes System zur Zell-Zell – Erkennung und zur Regulierung der Zell-spezifischen Genexpression besitzt (Lee et al., 2010). Zur Paarung kommt es, wenn

a Zellen auf α Zellen treffen. Haploide **a** Zellen produzieren einen **a** Faktor zur Signalgebung an α Zellen; auf die gleiche Weise synthetisieren haploide α Zellen einen α Faktor, um **a** Zellen Signale zu übermitteln. Nach gegenseitiger Erkennung beider Kreuzungspartner fusionieren die beiden **a** und α Zellen und bilden eine diploide **a**/ α Zelle (Lee et al., 2010). Diese wiederum durchläuft Meiose und produzieren haploide, meiotische Nachkommen, zwei **a** und zwei α Zellen in einem Ascus (Galgoczy et al., 2004).

Der typische Lebenszyklus der Basidiomyceten besteht aus haploiden, monokaryotischen, sowie dikaryotischen Stadien. Das monokaryotische Stadium enthält Kerne eines einzigen genetischen Typs, und wird daher Homokaryon genannt. Dieses Myzel enthält einen Kern pro Zelle. Das Dikaryon wird gebildet, wenn sich genetisch unterschiedliche Homokaryoten paaren. In *Schizophyllum commune* wird die Paarung durch ein tetrapolares System reguliert, das aus zwei genetischen Komplexen besteht: A und B (Raudaskoski, Kothe, 2010). Dieser tetrapolare *MAT* Locus beinhaltet Pheromone, Pheromonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren (Lee et al., 2010). Tetrapolar bezieht sich auf die Tatsache, dass es vier verschiedene Möglichkeiten zur Paarung zwischen den haploiden Partnern gibt. Zur Induktion sexueller Entwicklung müssen die Partner auf die Bindung der Liganden an den Pheromonrezeptor reagieren, indem eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die zur Dikaryotisation führt (Raudaskoski, Kothe, 2010). Es wird vermutet, dass die Interaktion der Pheromone mit den Rezeptoren eine wichtige Rolle für den Austausch und Migration der Zellkerne zwischen den Kreuzungspartnern spielt (Raudaskoski, 1998).

1.2 Lebenszyklus der Zygomyceten

Die Zygomyceten haben wiederum ein anderes System der sexuellen Kommunikation entwickelt. Bereits des Lebenszyklus unterscheidet sich erheblich: Die Sporangiosporen von *Mucor mucedo* enthalten mehrere Nuclei, welche auskeimen, wenn sie auf ein geeignetes Substrat gelangen (vergl. Abb.1.1). Nach ein paar Stunden bricht eine Hyphe durch die äußere Sporenwand, wächst und verzweigt sich. Lufthyphen bilden sich und im weiteren Verlauf die Sporangien mit den darin enthaltenen Sporangiosporen. Dieses Verhalten ist dann ausgeprägt, wenn

nur jeweils einer der beiden Paarungstypen, (+), bzw. (-) vorhanden ist (The Fungi, 2nd Edition, 2001; M. Carlile, S.C. Watkinson, G. W. Gooday,).

Treffen nun aber (+)- und (-)- Typ einer Art aufeinander, wachsen die Spitzen der Zygophoren aufeinander zu und entwickeln zwei mehrkernige Progametangien. Jedes Progametangium entwickelt sich in ein Gametangium durch die Produktion einer Zellwand. Dadurch grenzt es sich von der benachbarten Region der Zygophore ab. Die Zellwand, die die beiden Gametangien trennt, löst sich auf, so dass sich aus

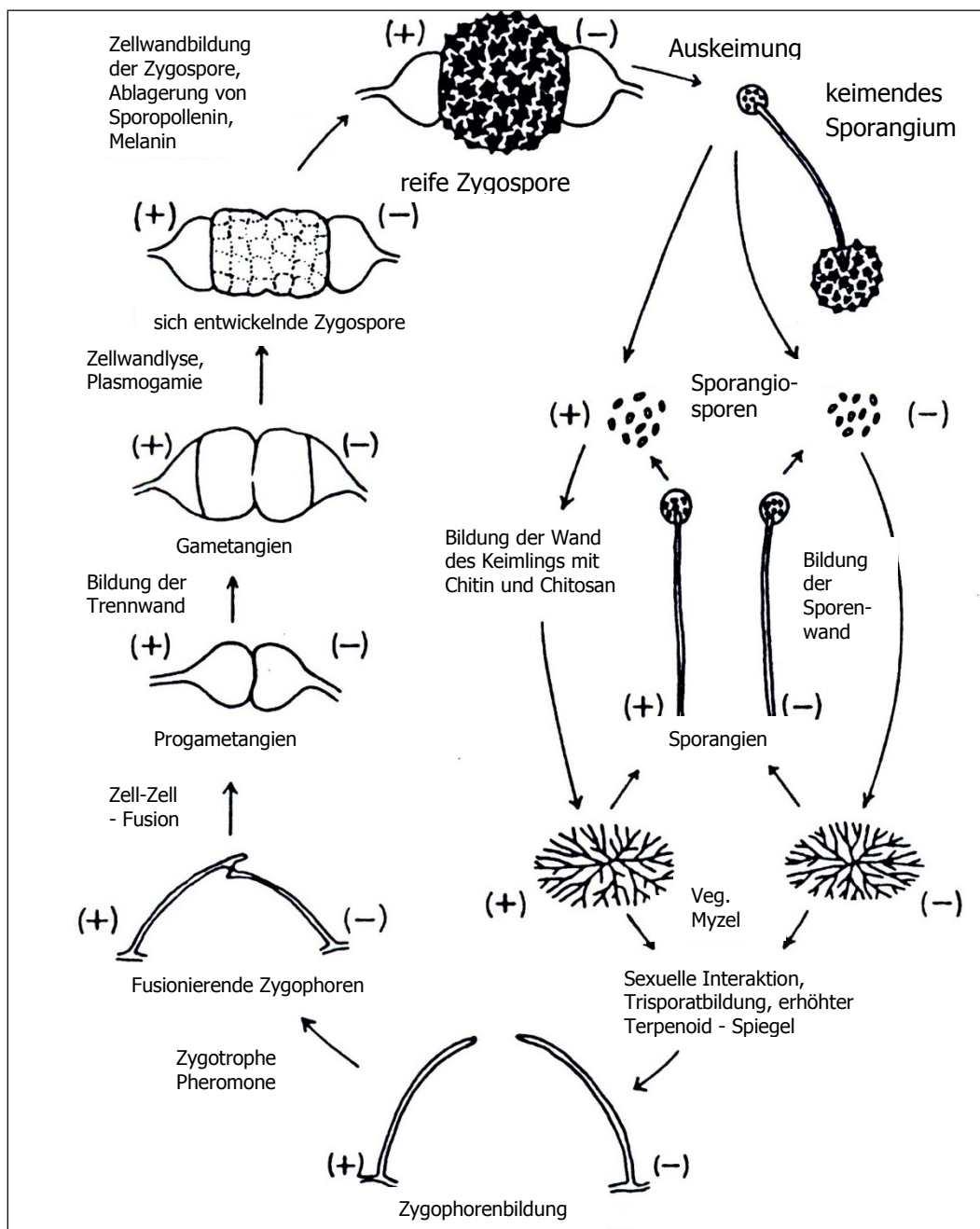


Abb. 1.1 Lebenszyklus der Zygomyceten (nach Gooday, 1973)

den vereinigten Gametangien eine Zygosporangie entwickelt. Die diploiden Kerne durchlaufen nun Meiose, wobei nur einer der entstehenden haploiden Kerne überlebt und seinerseits auskeimen und Sporangiosporen bilden kann. Dies geschieht jedoch nur unter geeigneten Umweltbedingungen.

Pheromone, die sogenannte Trisporsäure und ihre Vorläufer sind an der Regulation der Paarungsreaktionen der Zygomyceten beteiligt (Schimek et al., 2003). Da dieses Signalsystem von verschiedenen Arten benutzt wird, kommt es häufig auch zu interspezifischen Reaktionen. Jedoch werden nur bei einem Aufeinandertreffen zweier Stränge derselben Art Zygosporangien gebildet (Schachtschabel et al., 2005). Die Menge der gebildeten Trisporsäure variiert zwischen den Arten, ebenso wie das Spektrum der Trisporoidderivate und Isomere (Wöstemeyer et al., 2007).

Phycomyces blakesleeanus und *Mucor mucedo* produzieren nur geringe Mengen an Trisporoiden, wohingegen *Blakeslea trispora* in Kreuzkulturen ungefähr 20 mg/Liter produziert (Wetzel et al., 2009).

1.3 Sexuelle Kommunikation bei Zygomyceten

Trisporsäure wird über einen komplexen Signalweg gebildet. Keiner der komplementären Partner kann Trisporsäure alleine synthetisieren. Es ist vielmehr ein System, das auf Kommunikation und Austausch von Metaboliten dieser beiden Partner beruht. Die Biosynthese beginnt mit der oxidativen Spaltung von β -Carotin in beiden Partnern zu Retinal durch die Carotinoxygenase (Schimek et al. 2009) (Abb. 1.2).

Nach mehreren Schritten entsteht durch die 4-Dihydrotrisporin Dehydrogenase 4-Dihydrotrisporin, welches das letzte, in beiden Partnern gleichsam gebildete Produkt ist. Im (-)-Typ wird dies zu Trisporin umgewandelt, diffundiert zum (+)-Typ, wo es zu Trisporol hydroxyliert wird, um schließlich in Trisporsäure umgewandelt zu werden.

Im (+)-Typ wird 4-Dihydrotrisporin zu 4-Dihydromethyltrisporat, das im Gegenzug zum (-)-Typ diffundiert, wo es durch 4-Dehydromethyltrisporat Dehydrogenase zu Methyltrisporat umgewandelt wird. Im (-)-Typ entsteht nun aus Methyltrisporat ebenfalls Trisporsäure (Schachtschabel et al., 2005). Diese Vorläufer der Trisporsäure können nicht eigenständig von beiden Partnern metabolisiert werden, sondern müssen zwischen den Kreuzungspartnern ausgetauscht werden. (Bu' Lock et al., 1973). Die Produktion der Trisporsäure ist also auf die Kreuzungspartner

begrenzt, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden (Schimek et al., 2003). Die Vorläufer der Trisposäure agieren als Pheromone. Sie sind an der Erkennung des Kreuzungspartners und der Induktion der Zygophoren im komplementären Kreuzungspartner beteiligt (Mesland et al, 1974).

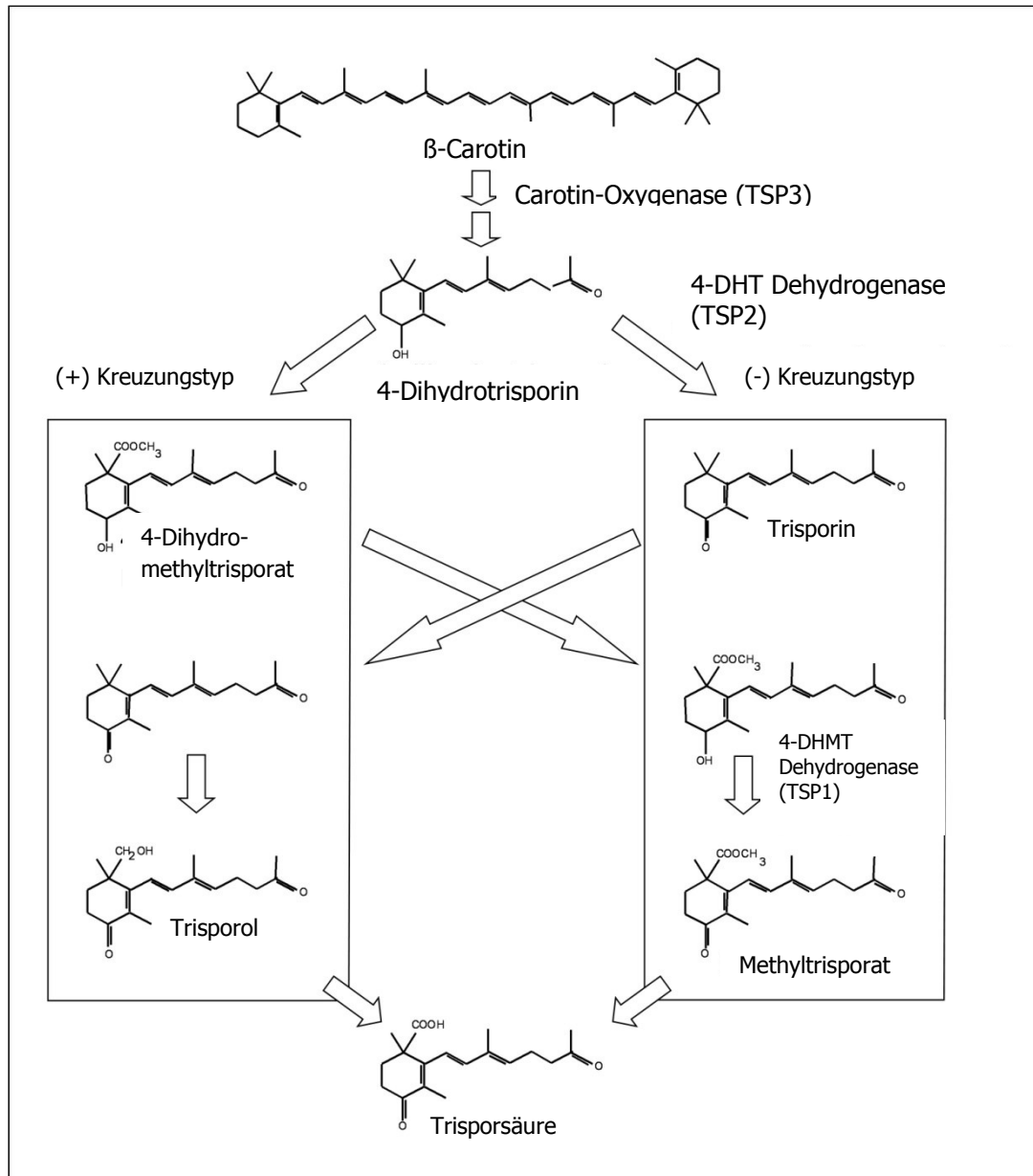


Abb. 1.2 Entstehung der Trisposäure (aus: Schachtschabel et al., 2005)

Obwohl Trisposäure der verantwortliche Faktor für die Induktion der Zygophoren ist, ist sie nicht flüchtig und kann daher nicht für eine durch die Luft induzierte Anziehung der (+)- und (-) Typen verantwortlich gemacht werden. Diese gegenseitige Anziehung

scheint eher auf die Diffusion der flüchtigen Typ-spezifischen Vorläufersubstanzen der Trisporsäure zurück zu führen sein.

Interspezifische sexuelle Reaktionen innerhalb der *Mucorales* geschehen häufig. Da dieser Gruppe kennzeichnende morphologische Strukturen fehlen, welche die Kreuzungspartner definieren, werden interspezifische Kreuzungsversuche benutzt, um die Kreuzungspartner neuer Isolate zu klassifizieren. Das Ausmaß der interspezifischen Reaktionen reicht von sehr frühen Stufen wie Wachstumsstop über die Induktion von Zygothoren bis zur Bildung von Gametangien (Burgeff, 1924). Echte Kreuzungen verschiedener Arten, aus denen reife Zygosporangien hervorgehen, wurden jedoch nie beschrieben.

Fakultative Mykoparasiten innerhalb der *Mucorales* sind ebenfalls in der Lage, die Kreuzungstypen ihrer Wirtsorganismen zu unterscheiden (Burgeff, 1924). *Parasitella parasitica* (+) infiziert ausschließlich *Absidia glauca* (-) und *Parasitella parasitica* (-) infiziert nur *Absidia glauca* (+). Diese interspezifischen Reaktionen lassen sich nur durch die Tatsache erklären, dass alle *Mucorales* dasselbe Signalsystem für die sexuelle Kommunikation benutzen. Die Trisporsäure und Trisporsäure-Vorläufer agieren als intra- und interzelluläre Botenstoffe (Wöstemeyer et al, 1995).

Trisporoide, die aus verschiedenen Arten (u.a. *Blakeslea trispora*) isoliert wurden, induzieren Zygothorenbildung bei *Mucor mucedo* (van den Ende, 1968). Sie rufen weitere interspezifische Reaktionen hervor, die mit dem sexuellen Prozess zusammenhängen, wie Wachstumsstop und eine Zunahme der β -Carotin Produktion. Über die Induktion der Zygothoren hinaus stimuliert Trisporsäure die Produktion von β -Carotin und anderen Intermediaten, was wiederum zur Bildung von Trisporsäure führt, so dass ein positiver Feedback-Loop entsteht (Werkman & van den Ende 1973).

Noch ist ungeklärt, auf welche Weise sich die komplementären *Mucor mucedo* Kreuzungspartner erkennen. Welche Rezeptoren an der Zellwand oder Zellmembran eine Rolle bei der Bindung der Trisporsäure und deren Vorläufer eine Rolle spielen, ist ebenso unklar.

1.4 Zellwand-assoziierte Proteine

Die Zelloberfläche von Pilzen ist an einer kleinen Anzahl Arten untersucht worden, wobei sich herausgestellt hat, dass es sowohl große Variationen zwischen den Arten,

als auch in den einzelnen Zelltypen der Pilze gibt. Die Konstruktion der Pilzzellwand kann sich als Antwort auf Umwelteinflüsse verändern, wie zum Beispiel osmotischer Schock (Blomberg et al., 1992). In allen Fällen sind die Hauptkomponenten jedoch Polysaccharide: Chitin, Glucane und Mannoproteine im Falle von Ascomyceten und Basidiomyceten, Chitosan, Chitin und Polyglucuronsäure bei Zygomyceten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der *Mucor spp.* Zellwand haben ergeben, dass die Wände der Hyphen relativ dünn, kompakt, nicht-fibrös und undifferenziert sind im Vergleich zu den Zellwänden von Hefen, die dick, fibrös und in zwei Schichten organisiert sind (Orlowski, 1991).

Da jedoch Trisporsäure vom komplementären Partner erkannt wird, muss es zumindest hierfür Rezeptoren an der Zelloberfläche geben, um darauf reagieren zu können. Welche das sind, ist noch unbekannt, genauso, ob es für die Erkennung der Trisporsäurevorläufer weitere Rezeptoren gibt.

Wahrscheinlich gibt es Proteine an der Zelloberfläche, die nicht auf Trisporsäure reagieren, jedoch dennoch wichtig sind für die Erkennung des komplementären Partners.

Möglicherweise ist auch die Art der Zellwand-assoziierten Proteine unterschiedlich im Vergleich vom (+)- zum (-)Typ. Da sich bereits die Morphologie des Myzels zwischen (+) und (-) gerade im Anfangsstadium unterscheidet, ist damit zu rechnen, dass auch die Proteine an der Zelloberfläche unterschiedliche sein mögen. Möglicherweise benötigt der (+) Typ andere Erkennungsproteine für den (-) Typ als umgekehrt der (-) für den (+) Typ.

1.4.1 Zell-Zell- Erkennung bei *Saccharomyces cerevisiae*

Als Beispiel für die Erkennung des komplementären Kreuzungspartners sei hier *Saccharomyces cerevisiae* erwähnt. Haploide Zellen von *S. cerevisiae* synthetisieren kreuzungspartnerspezifische Zelloberflächenproteine, die Agglutinine. Die Synthese von α - und α - Agglutinin wird durch das Pheromon induziert, das vom korrespondierenden Kreuzungspartner produziert wird (Betz et al., 1978; Fehrenbacher et al., 1978). Beide Agglutinine sind glykosylierte Proteine. Die Differenzierung der Gameten wird durch eine Signaltransduktion induziert, die durch Pheromone und ihre Rezeptoren ausgelöst wird. Die Zelladhäsion kommt durch die Agglutininierung durch Zelloberflächenglykoproteine zustande (Yanagishima and

Yoshida, 1981; Betz et al., 1981). Diese Prozesse an der Zelloberfläche sind wichtig für die Paarung, da die Induktion der Gameten und der Zelladhäsion Voraussetzungen für die folgende Fusion der Zellwand und Plasmamembran bei den Kreuzungspartnern sind. Die sexuelle Agglutininierung entsteht durch das komplementäre Binden der Zellwandglykoproteine, den **a**- und α -Agglutininen (Yanagishima and Yoshida, 1981). Das **a**- Agglutinin besteht aus den Produkten des AGA1 Gens und des AGA2 Gens, welches Zell-Zell-Bindeaktivitäten besitzt (Cappellaro et al., 1991). Die Aminosäureregion 259-331 des α - Agglutinin ist wichtig für die Agglutininierung und zeigt eine schwache Homologie zur Immunoglobulin – Faltdomäne (Wojeciechowicz et al., 1993).

Zur Klärung solcher oder ähnlicher Vorgänge bei der Erkennung des komplementären Kreuzungspartners beim Zygomyceten *Mucor mucedo* werden in der vorliegenden Dissertation daher unter anderem die Zellwand-assoziierten Proteine untersucht.

1.5 Ziel der Arbeit

Da über die Vorgehensweise bei der gegenseitigen Erkennung der (+)- und (-) Typen von *Mucor mucedo* recht wenig bekannt ist (außer dem gut untersuchten Trisporsäuresignalweg), soll dies im Folgenden experimentell geklärt werden.

Zunächst wird mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht, ob und in wie weit sich das Proteinmuster des (-)- vom (+)-Typ an der Zellwandoberfläche unterscheidet. Dies soll in mehreren Stadien geschehen: Zunächst im **Bodenmyzelstadium**, bei dem weder Sporangien noch Zygomphoren sichtbar sind und zwar sowohl im (-)- und (+)-Typ als auch in Kreuzkulturen. Darüber hinaus ist natürlich das **ausdifferenzierte sexuelle** Stadium wichtig, in dem sich in den mit Trisporsäure behandelten Einzelkulturen Zygomphoren gebildet haben, sowie Kreuzkulturen, in denen das Zygosporienstadium erreicht worden ist. In den **ausdifferenzierten asexuellen**, nicht mit Trisporsäure behandelten Einzelkulturen, wird das Sporangienstadium beider Kreuzungspartner untersucht. Hierbei wird das Proteinmuster auf den 2D-Gelen von unbehandelten Kulturen, in denen Sporangien zu erkennen sind, mit behandelten Zygomphoren-bildenden Kulturen und dem Bodenmyzel-Stadium verglichen. Dies geschieht jeweils sowohl mit den Einzel- als auch mit den Kreuzkulturen. Sollte sich

das Proteinmuster der Zytophoren- bzw. sogar Zygosporienstadien deutlich vom Bodenmyzel- und Sporangienstadium unterscheiden, ist dies von größtem Interesse, denn dann kann angenommen werden, dass diese Proteine direkt etwas mit der Erkennung des komplementären Partners zu tun haben. Werden hierbei also Unterschiede deutlich, werden diese Proteinpunkte ausgeschnitten und analysiert. Im weiteren Verlauf werden für diese Sequenzen Primer konstruiert werden, um die zugehörigen Gene klonieren und sequenzieren zu können.

Auf der Transkriptionsebene wird daraufhin untersucht werden, ob diese Gene konstitutiv transkribiert werden, um dann posttranslational in verschiedenen Stadien sichtbar zu werden.

Dies soll sich nun nicht auf die Zellwand-assoziierten Proteine beschränken, denn auch die damit verbundenen Signaltransduktionswege mögen neue Erkenntnisse über die Erkennungsreaktionen zwischen den komplementären Paarungspartnern ergeben. Daher werden die 2D-Gelexperimente mit anschließender Analyse der unterschiedlichen Proteinmuster auch auf zytoplasmatischer Ebene durchgeführt.

Zur Untersuchung der Bestandteile der Zellwand werden Zellwandfärbungen und HPLC – Analysen durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agens	Hersteller	Cat.#
Aceton	Roth	CP40.3
Acetonitril	Roth	8825.2
Agar	Roth	5210.5
Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH	35-1020
Acrylamid	Serva	10674
Albumin, bovine	Sigma-Aldrich	A-7906
Ammoniumchlorid	Merck	1011415000
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	101201
Bromophenolblau	BioRad	161-0404
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich	B 9643-1L
Bio-Lyte 3/10	BioRad	163-1113
Blocking Reagenz	Roche	11096176001
Calciumchlorid (99%)	Merck	2381.1000
Calcofluor white	Sigma-Aldrich	18909
Coomassie Brilliant Blue R 250	Roth	3862.2
CHAPS (98%)	Sigma-Aldrich	C 9426-5G
ConcanavalinA	Invitrogen	C8727
Desoxynukleosidtriphosphate	Fermentas	R1122
Dream Taq™ DNA Polymerase	Fermentas	EP0702
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	276855
1,4 Dithiothreitol	biomol	04010.25
EDTA	Roth	8040.3
Eosin Y	Fluka	GA12212
Essigsäure (96%)	Roth	T179.2
Ethanol	Merck	108543
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	E7637
Formaldehyd	Roth	4989.1
Formamid	Roth	6749.2
Gene Ruler™ 1kb DNA ladder	Fermentas	SM0311

Material

Agens	Hersteller	Cat.#
Glucose Monohydrat	Merck	108342
Glycerin (86%)	Roth	4043.1
Glycin ($\geq 99\%$)	Roth	3908.3
Hefeextrakt	Roth	2363.2
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich	I6125-25G
Isopropanol	Roth	6752.2
Kaliumdihydrogenphosphat ($\geq 99\%$)	Roth	3904.3
di-Kaliumhydrogenphosphat	CIECH	081272
Kaliumnitrat	Merck	A539693 452
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich	087K5306
Lithiumchlorid (99,2%)	Roth	3739
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck	1.05833.1000
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\geq 99\%$)	Roth	P027.2
Maltose	Merck	105910
2-Mercaptoethanol (99%)	Roth	4227.1
Methanol	Roth	HN41.2
Natriumacetat	Roth	6773.3
Natriumchlorid	Merck	106406
Natriumdihydrogenphosphat	VK Labor- und	16182
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth	6771.1
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Serva	29196
PCR – buffer – MgCl_2	Fermentas	Lot 8202
Periodsäure	J.T.Baker	1366
Phenylmethansulfonylfluorid	Fluka	78830
Polyethylenglykol (6000)	Serva	33137
Ribonukleinsäure A	Sigma-Aldrich	R-9009
Salzsäure	Merck	1.00319.2500
Schiffs Reagenz	Merck	1.09034.1000
Sodiumdodecylsulfat	biomol	51430
Stickstoff		

Material

Agens	Hersteller	Cat. #
TEMED	BioRad	161-0801
Thiourea	Sigma-Aldrich	T8656-100G
Tris	Roth	4855.3
Trichloressigsäure (99%)	Roth	8789.1
Trichlormethan	Roth	3313.2
Triton X-100	Roth	3051.2
Trypsin	Roche	11418025001
Urea	Sigma-Aldrich	U6504-1K
Xylene Cyanol FF	BioRad	161-0423

2.2 Stämme

Stamm	Herkunft
<i>Mucor mucedo</i> (-) FSU 620	Friedrich-Schiller Universität Jena
<i>Mucor mucedo</i> (+) FSU 621	Friedrich-Schiller Universität Jena
<i>Absidia glauca</i> (-) 101.48	CBS
<i>Absidia glauca</i> (+) 100.48	CBS

2.3 Kulturmedien

Bezeichnung	Menge	Agens
Supplementiertes	10 g	Glucose Monohydrat
Minimalmedium (1L)	(12 g)	Agar
	1 g	Ammoniumchlorid
	4 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	0,9 g	di-Kaliumhydrogenphosphat
	0,25 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
	5 g	Hefeextrakt
	1 ml	Calciumchlorid (0,1M)

Material		
Induktionsmedium (1L)	20 g	Maltose
	12 g	Agar
	10 g	Kaliumnitrat
	5 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	2,5 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
	1g	Hefeextrakt
LB-Medium (500 ml)	5 g	Trypton
	2,5 g	Hefeextrakt
	5 g	Natriumchlorid
	(6 g)	(Agar)
Maltosemedium (1L)	20 g	Maltose
	0,1 g	Natriumdihydrogenphosphat

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 IEF

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
Äquilibrierungspuffer I	5,4 g	Urea
	0,3 g	SDS (10%)
	1,9 ml	3 M Tris-HCl pH 8.8
	3, 45 ml	Glycerol (86%)
	300 mg	DTT
	ad 15 ml	A. bidest
Äquilibrierungspuffer II	5,4 g	Urea
	0,3 g	SDS (10%)
	1,9 ml	3 M Tris – HCl pH 8,8
	3, 45 ml	Glycerol (86%)
	375 mg	Iodoacetamid
	ad 15 ml	A. bidest
Rehydrierungspuffer	7 M	Urea
	2 M	Thiourea
	4 %	CHAPS
	Spatelspitze	Bromophenolblau

2.4.2 2D – Gelelektrophorese

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
Trenngel -Puffer , pH 8.8	3 M	Tris base HCl (32%)
Laufpuffer (5x)	250 mM	Tris Base
	2 M	Glycin
Trenngel (12%)	144 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
für 6 2D-Gele	45 ml	3 M Tris – HCl pH 8,8
	3,6 ml	SDS (10%)
	360 µl	TEMED
	1080 µl	APS (10%)
	167 ml	A. bidest
Coomassie	1 g	Coomassie R 250
	250 ml	2 – Propanol
	100 ml	Essigsäure
	ad 1 L	A. bidest
Entfärber	30 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
	ad 1 L	A. bidest

2.4.3 DNA – Extraktion

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
Extraktionspuffer	0,15 M	EDTA
	50 mM	Tris – HCl pH 8
	20 mM	NaCl
	1 %	SDS

2.4.4 Agarosegele

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
TAE – Puffer (10x)	48,8 g	Tris base
	16,4 g	Natriumacetat (wasserfrei)
	3,8 g	EDTA
	ad 1 L	H ₂ O (1 µS)
	pH auf 7,8 eingestellt	Essigsäure

2.4.5 Isolierung der Zellwandproteine

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
LiCl	1 M	Lithiumchlorid
	20 mM	Natriumdihydrogenphosphat
	0,1 mM	Phenylmethansulfonylfluorid

2.4.6 Gene Clean

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
New – Wash Lösung	20 mM	Tris-HCl pH 7.2
	200 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	51 %	Ethanol p.a.

2.4.7 Zellwandfärbung

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
PBS	0,2 g	Kaliumchlorid
	0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	1,15 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	8 g	Natriumchlorid
	ad 1L	A. bidest
McIlvaine's Puffer	0.1 M (davon 36.8 ml)	Zitronensäure
	0.2 M (davon 63.2 ml)	Dinatriumhydrogenphosphat
	pH 6	

2.4.8 Allgemeine Lösungen

Bezeichnung	Konzentration bzw. Menge	Agens
EDTA pH 8	0,5 M	EDTA
		NaOH
NaCl	4 M	Natriumchlorid
NaAc	1 M	Natriumacetat
Tris pH 8	1 M	Tris base
		HCl
NaOH	10 M	Natriumhydroxid

2.5 Primersequenzen

2.5.1 Degenerierte Primer

Bezeichnung	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
z3	5'gcgaattcatgggicaygargt 3'	5'gcctgcagrtctrgiacrtaytgraa 3'
z8	5'gcgaattcggngaygaycargg 3'	5'gcctgcagrcadatngtrtcytrtc 3'
z9	5'gcgaattcgartayggitaygt 3'	5'gcctgcagttytgrtgngcickytg 3'

Material

11Zellw	5'gccaattcaayathwsicnta 3'	5'gcctgcagcatiswickraacca 3'
d3	5'gccaattcaaratggtiatgcaygc 3'	5'gcctgcaggtrttiaccartaytt 3'
d5	5'gccaattctgyttyathaaygc 3'	5'gcctgcagtcrtadatdatnac 3'
d6	5'gccaattcyuigaygayathtt 3'	5'gcctgcagatrttngtiarickrtg 3'
d7	5'gccaattcgiggnccargarga 3'	5'gcctgcagyttnngcswrcaytc 3'
d10	5'gccaattccarcargargcntgg 3'	5'gcctgcagacytgytgrtgcat 3'
A2	5'gccaattcttyacnaargarga 3'	5' gcctgcagtcytytctartc 3'
A3	5'gccaattctaygayathgtnaayac 3'	5' gcctgcagggtcatnccnggytt 3'
A4	5' gccaattcgarccnaaycaygg 3'	5' gcctgcagcatcatdatcatncc 3'
A7	5'gcgattcccngaratgatgcc 3'	5' gcctgcagtcccangtraaytc 3'

2.5.2 RAPD Primer

P-06: 5' – gaaacagcgg – 3'

B-18: 5' – ccacagcagt – 3'

P-08: 5' – ggagcccac – 3'

X-07: 5' – ccacaaacgc – 3'

P-17: 5' – ggcatcggcc – 3'

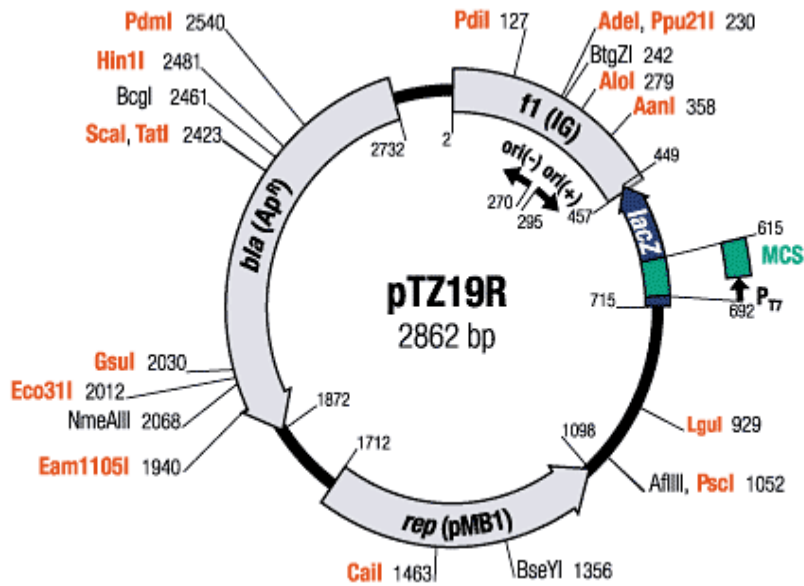
Y-17: 5' – ggctggttcc – 3'

P-21: 5' – gtgagcgtc – 3'

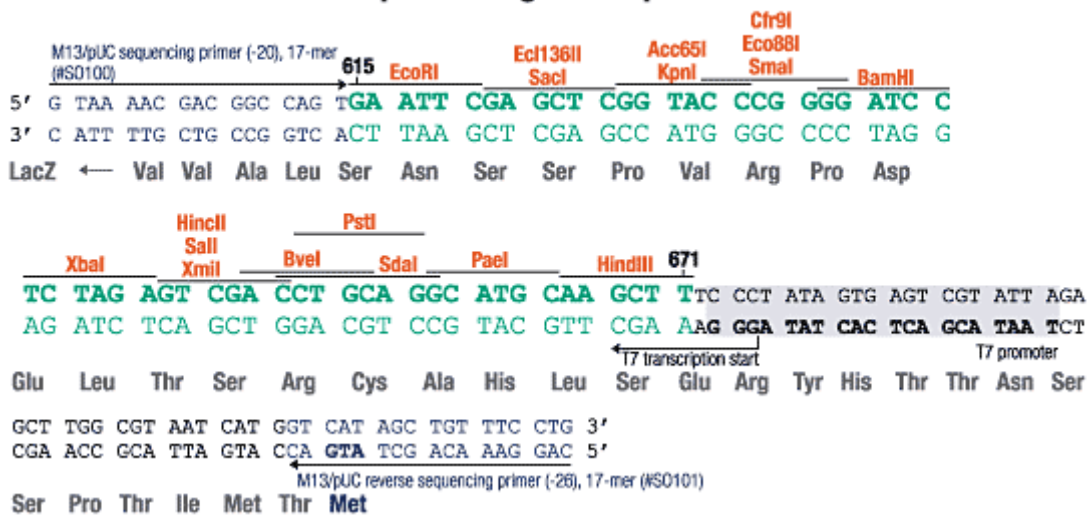
2.6 Klonierung

2.6.1Vektor

Agens	Hersteller	Cat.#
pTZ19R DNA	Fermentas	SD0141



Multiple cloning site of pTZ19R/U



2.6.2 Puffer, Enzyme

Agens	Hersteller	Cat. #
10 x Ligationspuffer	Fermentas	EL0011
EcoRI	Fermentas	ER0271
PstI	Fermentas	ER0611
T4 – Ligase	Fermentas	EL0011

3 Methoden

3.1 Kultivierung

3.1.1 Anzucht zur Proteinisolierung

Aus einer Sporensuspension ($2,5 \cdot 10^7$ Sporen/ml) von *Mucor mucedo* (-), (+) Einzel-, sowie Kreuzkulturen wurde eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt. Davon wurden je 200 µl auf eine mit Einmachfolie ausgelegte Agarplatte (Induktionsmedium, siehe 2.3) ausplattiert und im Dunkeln bei RT inkubiert bis das entsprechende Stadium erreicht worden war. Es wurden (-)- (+)- und Kreuzkulturen im Bodenmyzelstadium, im Trisporsäure (TA) – induzierten Stadium (sexuelle Strukturen) und im unbehandelten Sporangien – Stadium (asexuelle Strukturen) geerntet. Zur Kontrolle wurde eine Lösemittelkontrolle (DMSO) mitgeführt.

3.1.1.1 TA – Induktion

Aus *Blakeslea trispora* isolierte Trisporsäure (3.1.3) wurde in der Konzentration von 50 µg/Platte auf die sich im einschichtigen Bodenmyzel befindenden *Mucor mucedo* (-), (+) Einzel- und Kreuzkulturen durch Sprühen aufgetragen. Die Trisporsäure war in DMSO gelöst worden. Nach 18 Stunden wurden die Kulturen wie unter 3.2 bzw. 3.3 beschrieben geerntet. In diesem Stadium hatten sich auf den (-) und (+) – Platten Zygothoren gebildet, auf den Kreuzkulturen waren darüber hinaus Gametangien vorhanden.

3.1.2 Anzucht zur DNA – Isolierung

In einen Kolben mit je 100 ml flüssigem SUP-Medium (supplementiertes Minimalmedium, siehe 2.3; Wöstemeyer, 1985) wurden 30 µl einer Sporensuspension ($2,5 \cdot 10^7$ Sporen/ml) *Mucor mucedo* (-) bzw. (+) gegeben. Die Kulturen wurden 3 Tage auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.3 Extraktion von Trisporoiden aus *Blakeslea trispora* Flüssigkulturen

Je 100 ml flüssiges SUP- Medium (2.3) wurden in 120 sterile 500 ml Glaskolben gegeben. Je 60 davon wurden mit einem mit *Blakeslea trispora* (-) bewachsenen Agarblock inokuliert, 60 weitere Glaskolben mit einem mit *Blakeslea trispora* (+) bewachsenen Agarblock. Die Glaskolben wurden auf einem Schüttler bei 20 °C 3 Tage inkubiert.

Am dritten Tag wurden in 60 weitere, sterile 500 ml Glaskolben je 100 ml flüssiges Maltosemedium (2.3) gegeben. Je ein Glaskolben mit angezogenem *Blakeslea trispora* (-) und ein Kolben mit *Blakeslea trispora* (+) wurden in einen sterilen Sieb gegeben, dadurch vom SUP- Medium getrennt und mit etwas Maltosemedium gewaschen. Danach wurde das Myzel von je einem (-)-, bzw. (+) – Kolben zusammen in einen neuen, sterilen Kolben mit 100 ml Maltosemedium überführt und bei 20 °C im Dunkeln 6 Tage auf einem Schüttler inkubiert.

Zur Extraktion der Trisporoide wurden die Kulturen anschließend über einen Filter gegeben und das Maltosemedium, in dem sich nun die Trisporoide befanden, aufgefangen. Der pH des Filtrats wurde mit 1 M KOH auf 8.0 eingestellt. Das Filtrat wurde in 500 ml Portionen mithilfe von 500 ml Extraktionslösung (100:5 Trichlormethan : 2-Propanol) in einem Scheidetrichter extrahiert. Nach Trennung der Phasen waren in der unteren, organischen Phase die Trisporoide enthalten. Auf diese Weise wurde mit dem gesamten Filtrat verfahren. Zum Trisporoidextrakt wurden 5-6 Spatel wasserfreies NaSO₄ gegeben um Restwasser zu binden. Am nächsten Tag wurde das Extrakt wurde erneut gefiltert, das restliche NaSO₄ entfernt und im Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das getrocknete, konzentrierte Trisporoidprodukt wurde in 4-8 ml DMSO gelöst und in schwarzen Flaschen (lichtempfindlich) bei -20 °C gelagert (van den Ende, 1972). Zur Bestimmung der Trisporensäurekonzentration wurde ein Absorptionsspektrum zwischen 200 und 400 nm aufgenommen. Anhand des Peaks bei ca. 322 nm konnte die Konzentration bestimmt werden.

3.2 Proteinisolierung (zytosolisch)

Sobald das entsprechende Stadium erreicht worden war (3.1.1), wurde das Myzel von der Einmachfolie abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff gemörsert (60

Platten pro Stadium und Kreuzungstyp) bis ein feines Pulver entstand. Das Pulver wurde gewogen und 50 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5 – Puffer pro Gramm gemörsertem Myzel zugegeben. Anschließend wurde das Myzel unter Rühren auf Eis vorsichtig aufgetaut bis eine homogene Masse entstand. Bei 4 °C wurde bei 10 000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proben in Aliquots von je 100 µl bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C eingefroren.

3.3 Proteinisolierung (Zellwand – assoziierte Proteine)

Nach Teepe et al, 1988. Im gewünschten Stadium wurden je 60 mit Myzel bewachsene Einmachfolien in 100 ml 1M Lithiumchlorid (Lösung siehe 2.4.5) getaucht und das Myzel durch Schwenken vorsichtig abgelöst. Der Behälter wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, danach das Myzel entfernt und die Flüssigkeit bei 4 °C, 10 000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Proteine mit 20 % TCA über Nacht auf Eis gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine bei 4 °C, 10 000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 90 % Aceton gewaschen, danach in 400 µl 100 mM Tris-HCl pH 8,8 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

3.4 Proteinfällung

Für die Fällung zytosolischer Proteine aus Proben von IM-Platten wurde das entsprechende Eppendorfgefäß mit dem Proteinüberstand (siehe 3.2) bei 12 000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteine durch Zugabe von 250 µl einer 20% TCA-Lösung 30 Minuten auf Eis gefällt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 12 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 90% Aceton gewaschen, in 400 µl 100 mM Tris-HCL pH 8,8 aufgenommen und bei – 20 °C eingefroren.

3.5 Konzentrationsbestimmung der Proteinproben

Als Referenz wurden Proben mit 0, 100, 250, 500, 750 und 1000 µg BSA/ml im Photometer gemessen, die im selben Puffer gelöst worden waren wie die Proben. Von den Proben wurden je eine 1:10 und eine 1:20 Verdünnung hergestellt. Sowohl

Referenzproben als auch die zu bestimmenden Proben wurden mit 1 ml einer Bicinchoninsäure/Cu²⁺ (50:1) Lösung versetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben und Referenzen im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Anhand der Eichgerade wurde die Proteinmenge der Proben bestimmt.

3.6 Rehydrierung der IEF – Streifen

Pro Streifen wurden 300 µl des Rehydrierungspuffers (2.4.1) in eine Rehydrierungswanne gegeben, dann der Streifen mit der beschichteten Seite nach unten darauf gelegt und mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Die Streifen wurden über Nacht bei 20 °C passiv rehydriert (Anleitung nach BioRad).

3.7 Fokussierung der IEF – Streifen

Die Proben wurden mit 2 µl Ampholyte und 10 µl DTT (0,5 M) versetzt und mit Rehydrierungspuffer auf 100 µl aufgefüllt.

Die Streifen wurden mit der beschichteten Seite nach oben am + -Ende an die Anode der Fokussierwanne angelegt und durch „Cup Loading“ die Proteine aufgetragen. Danach wurden die Streifen mit 2 ml Mineralöl überschichtet und mit folgendem Programm fokussiert: Step 1: 250 V für 15 Minuten, Step 2 : 10 000 V für 3 Stunden; Step 3: 10 000 V für 60 000 V-Stunden, Step 4: 500 V hold (Anleitung nach BioRad).

3.8 Äquilibration der IEF – Streifen

Direkt nach der Fokussierung wurden die Streifen mit der beschichteten Seite nach oben in eine Rehydrierungswanne gelegt und mit je 3 ml des Äquilibrationpuffers I (2.4.1) überschichtet. Unter leichtem Schütteln wurden sie 12 Minuten inkubiert, danach der Puffer entfernt, Äquilibrationpuffer II (2.4.1) aufgetragen und ebenfalls unter leichtem Schütteln für 12 Minuten inkubiert.

3.9 Elektrophorese der 2D – Gele

Die äquilibrierten Streifen wurden auf die mit 1x – Laufpuffer (2.4.2) überschichteten Trenngele (12%) gegeben und mit Agarose (0,125 g Agarose, 25 ml 1x – Laufpuffer, Bromophenolblau) überschichtet. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Gele

in der 6er Gelkammer bei 120 mV ca. 7 Stunden laufen gelassen. Danach wurden die Gele 30 Minuten in 20 % TCA fixiert und anschließend über Nacht in Coomassie gefärbt (Anleitung nach BioRad).

Am nächsten Tag wurde der Hintergrund durch mehrmaliges Wechseln des Entfärbers entfärbt.

3.10 In-Gel-Verdau

Zunächst wurden die entsprechenden 2D-Gele zweimal jeweils 10 Minuten in A.bidest gewaschen. Die ausgewählten Proteinpunkte eines 2D-Gels wurden ausgeschnitten und in je ein Eppendorfgefäß überführt. Die Gelpartikel wurden mit 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (1+1 v/v) für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 rpm gewaschen. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und je 100 µl Acetonitril zugegeben. Das Acetonitril wurde nach kurzer Zeit wieder abgenommen und die Gelstückchen in 100 µl 50 mM NH_4HCO_3 rehydriert. Nach 10 Minuten wurde 100 µl Acetonitril zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Flüssigkeit abgenommen und 100 µl Acetonitril zugegeben. Nachdem die Gelstückchen geschrumpft waren, wurde die Flüssigkeit wieder abgenommen und die Stückchen an der Luft getrocknet.

10 µl Trypsin (25 ng/µl) wurde mit 190 µl 25 mM NH_4HCO_3 gemischt. Davon wurden je 13 µl auf ein Gelstück gegeben und für 30 Minuten auf Eis gequollen. Die Restflüssigkeit wurde abgenommen, 3 µl 25 mM NH_4HCO_3 zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Restflüssigkeit abgenommen. Für die Extraktion der Proteine wurde je 10 µl 0,1 % TFA/Acetonitril (1+1 v/v) zugegeben und 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur und 1000 rpm geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt (nach Prussak et al, 1989).

3.11 MS – Analyse

Es wurde je ein 1 µl der Probe (3.10) auf eine Platine gegeben und mit 1 µl Matrix versetzt. Die Proben wurden per MALDI – TOF MS am Hans – Knöll Institut, Jena analysiert. Die erhaltenen MS-Massen wurden bei MASCOT-Search eingegeben und

die Sequenzübereinstimmungen mit den Proteinsequenzen von *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Rhizopus oryzae* abgeglichen.

3.12 DNA – Isolierung

Das wie unter 3.1.2 beschrieben angezogene Myzel aus den Flüssigkulturen von *Mucor mucedo* (-) bzw. (+) wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und das so gewonnene Myzel in flüssigem Stickstoff gemörsert. Ein Teil des entstandenen Pulvers wurde in 5 ml Extraktionspuffer gegeben und für 1 Stunde bei 70 °C inkubiert. 1,2 ml 4 M NaCl wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei 5 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Greinertube gegeben. 100 mg festes PEG 6000 wurde pro ml Flüssigkeit eingewogen und langsam gemischt, bis es sich völlig gelöst hatte. Die Ansätze wurden 1 Stunde auf Eis gelassen und anschließend 10 Minuten bei 5 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 800 µl einer 0,3 M NaAc, 50 mM Tris-HCl pH 8 Lösung gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. 50 µl RNase A (1 mg/ml) wurden zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 0,4 ml Chloroform zugegeben, vorsichtig gemischt und 1 Minute bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ein Volumen 100 % Isopropanol zugegeben. Über Nacht wurde die DNA bei – 20 °C gefällt (Cole, 1991).

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 12 000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1 ml eiskaltes Ethanol (100%) zugegeben. Dies wurde zweimal wiederholt, der Überstand verworfen und erneut 2 Minuten bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde 30 Minuten in der SpeedVac getrocknet. Danach wurde das DNA – Pellet in 50-100 µl sterilem A. bidest gelöst und bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.12.1 Konzentrationsbestimmung der DNA

Von der wie unter 3.12 beschrieben isolierten DNA wurde eine 1:5 Verdünnung hergestellt. Davon wurden 1 µl, 2 µl und 5 µl auf ein TAE – Agarosegel (1%) aufgetragen. Für einen Konzentrationsabgleich wurden des Weiteren 1 µl, 2 µl und 5

µl einer definierten DNA – Menge aufgetragen. Anhand eines Vergleichs der Bandenstärke konnte die DNA – Konzentration bestimmt werden.

3.13 PCR – Durchführung

Zu aus *Mucor mucedo* (-) bzw. (+) isolierter DNA (7,5 ng pro PCR-Ansatz) wurden die entsprechenden Primer (je 1µl einer 100 pmol/µl Lsg.) pipettiert, sowie ein Mastermix bestehend aus 2 µl 2,5 mM dNTPs, 2,5 µl 10x Puffer Ø NH₄, 2 µl 25 mM MgCl₂, 14 µl H₂O bidest und 0,2 µl Taq – Polymerase.

Die Denaturierung der DNA lief bei 94 °C ab, das Annealing lag bei einer Temperatur von 45 °C, 50 °C oder 55 °C und die Elongation bei 72 °C. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Nach der PCR wurden die Proben auf ein 1 % Agarose Gel aufgetragen und die Banden bei 50 Volt aufgetrennt (nach Hart et al., 1990, Kellogg et al., 1990).

3.14 Isolierung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel

Nachdem die PCR-Fragmente auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurden sie aus dem Gel isoliert um sie für die Klonierung verwenden zu können. Zunächst wurden die entsprechenden Banden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zu jedem Gelstück wurde 1ml einer 6M Natriumjodidlösung gegeben. Dies wurde bis zur Auflösung des Gelstücks bei 55 °C inkubiert (Blin et al., 1975). Pro Gelstück wurde 5 µl Glasmilch zugegeben und 20 Minuten geschüttelt, um die DNA an die Glasmilch zu binden (Vogelstein und Gillespie, 1979). Die Proben wurden 1 Minute abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml New-Wash-Lösung (2.4) gewaschen. Die Ansätze wurden erneut 1 Minuten abzentrifugiert und der Waschvorgang wiederholt. Das Pellet wurde in 20 µl A. bidest aufgenommen und bei 55 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und enthielt nun das PCR-Fragment. Das Pellet wurde erneut in 10 µl A. bidest aufgenommen, weitere 10 Minuten bei 55 °C inkubiert und danach abzentrifugiert. Der Überstand enthielt weitere Mengen des PCR-Fragments und wurde mit dem vorigen Überstand vereint. Mit der gleichen Methode wurde der geschnittene Vektor aus dem Gel aufgereinigt.

3.15 Restriktionsverdau

Das zu verdauende Fragment bzw. der Vektor (pTZ19R, vergl. 2.6) wurde mit 1 Unit pro μg DNA EcoRI und PstI versetzt. Des Weiteren wurde der für die Enzyme geeignete Puffer hinzugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf die gewünschte Menge aufgefüllt. Der Verdau wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert (nach Scharf et al, 1986).

3.16 Ligation

Das enzymatisch verdaute Fragment und der geschnittene Vektor wurden mit 1 Unit T4-Ligase und 10x Ligationspuffer (incl. 5 mM ATP) gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf die gewünschte Menge aufgefüllt. Die Ligation wurde über Nacht bei 11°C im Ligationsbad durchgeführt.

3.17 Transformation

200 μl kompetente XL1-Blue *E.coli* Zellen wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Danach wurde das entsprechende, mit dem Vektor ligierte Fragment in die Zellsuspension gegeben in weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Bei 42 °C wurden anschließend daran die Zellen für 30 Sekunden bis 2 Minuten einem Hitzeschock ausgesetzt, so dass die Plasmide in die Zellen aufgenommen werden konnten. Nach dem Hitzeschock wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen 0,5 –1 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden 500 μl des Ansatzes auf eine LB-amp Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert (nach Mandel et al., 1970).

3.18 Plasmidpräparation

1 ml der Übernachtskultur wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt und 2 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 200 μl 50 mM Glucose, 10 mM EDTA und 25 mM TrisCl pH8 gelöst. Danach wurden 20 μl Lysozym (10mg/ml) zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 300 μl 0,2 M NaOH und 1 % SDS wurden hinzu pipettiert, vorsichtig gemischt und weitere 300 μl 3 M Kac pH 4,8 zugegeben. Nach dem Mischen wurde

wieder 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor das Gemisch 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert wurde.

400 µl des Überstand wurden in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt, 20 µl RNase (1mg/ml) zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 400 µl Chloroform dazugegeben, kurz gemischt und bei 13000 rpm 2 Minuten abzentrifugiert.

Die obere Bande wurde in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt und 400 µl Isopropanol dazu pipettiert, gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde erneut bei 13000 rpm 15 Minuten abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei – 20 °C aufbewahrt (nach Birnboim et al., 1979).

3.19 Kompetente Zellen

Es wurde eine Übernachtskultur mit XL1-Blue Zellen in LB-tet Medium angelegt und bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Am nächsten Tag wurde ein 200 ml Kolben mit 100 ml LB-tet Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt bis die Zellen eine OD_{600nm} von 0.4 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 4 °C, 6000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml 10mM Tris-HCl pH 8 und 0.1 M CaCl₂ langsam gelöst. Danach wurden die Zellen 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C, 6000 rpm 20 Minuten erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde langsam in 5 ml 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 M CaCl₂ und 20% Glycerin gelöst und in 200 µl Aliquots bei – 80 °C eingefroren (nach Mandel et al., 1970).

3.20 Zellwandfärbung mit Calcofluor white (CFW) und ConcanavalinA (ConA)

Die zu untersuchenden Strukturen von *Mucor mucedo* (-) und (+) wurden von der IM – Agarplatte geerntet und in 1 ml PBS gegeben, in dem CFW und ConA in einer Konzentration von 25 µg/ml bzw. 100 µg/ml vorlagen. Das Myzel wurde im Dunkeln 10 Minuten angefärbt, dann 2x mit PBS gewaschen. Die Myzelstrukturen wurden auf Objektträger gelegt und mittels eines Fluoreszenzmikroskops mikroskopiert.

3.21 Zellwandfärbung mit Eosin Y und CFW

Die zu untersuchenden Strukturen von *Mucor mucedo* (-) und (+) wurden von einer Agarplatte geerntet und in 1 ml McIlvaine's Puffer gegeben. 30 µl EosinY (5 mg/ml) und 2.5 µl CFW wurden dazu gegeben und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Myzel 2x mit McIlvaine's Puffer gewaschen und mittels eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert (McIlvaine, 1921, Baker et al., 2007).

3.22 Probenaufbereitung für HPLC

3.22.1 Zellwandextraktion

Die Kulturen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben, angezogen, das Myzel in den gewünschten Stadien geerntet und in flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben. Pro Probe wurden 500 mg gemörsertes Myzel in 2 ml destilliertem H₂O aufgenommen, auf zwei 1.5 ml Reaktionsgefäße verteilt und 0.4 g mit Säure behandelte Glasperlen dazugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden in einen "bead-beater" gestellt und das darin befindliche Myzel wurde durch die Glasperlen weiter aufgebrochen. Der Überstand wurde abgenommen, vereinigt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Glasperlen wurden mit 1 M NaCl gewaschen, der Überstand wurde mit dem vorigen vereinigt. Das zerriebene Myzel wurde nun bei 4 °C, 6000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml destilliertem H₂O aufgenommen. Es wurde in Reaktionsgefäße aliquotiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 11000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Puffer (10% SDS, 0.5 M EDTA, 1 M Tris, 14.3 M β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Auf einem Heizblock wurde es 10 Minuten bei 100 °C erhitzt, danach erneut bei Raumtemperatur, 11000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml destilliertem H₂O gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Parafilm abgedichtet, 3 Löcher in den Deckel gestanzt und in flüssigem Stickstoff gefroren, bevor es über Nacht in einen Gefriertrockner gestellt wurde (Fengel et al., 1979).

3.22.2 Saure Hydrolyse

Die Pellets wurden gewogen und gegebenenfalls die Aliquots wieder vereint, so dass eine Substanzmenge zwischen 1.3 und 2.2 mg vorhanden war. 500 µl Trifluoressigsäure wurde in jedes Reaktionsgefäß gegeben und mit geschlossenem Deckel 3 Stunden auf einem Heizblock bei 100 °C erhitzt. Danach wurden die Reaktionsgefäße 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Bei 80 °C (Heizblock) und geöffnetem Deckel wurde die Trifluoressigsäure verdampft. Um die Trifluoressigsäure herauszuwaschen, wurden 500 µl MQ H₂O zugegeben und bei 85 °C ebenfalls verdampft. Dieser Vorgang wurde wiederholt (Fengel et al., 1979).

3.22.3 HPLC – Analyse

Die Konzentration des Zellwandrests wurde auf eine Konzentration von 1mg Trockengewicht/100 µl MQ H₂O eingestellt und bei 14000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit MQ H₂O verdünnt und 50 µl davon in ein HPLC-Gefäß zur Analyse gegeben.

Pro HPLC – Analyse wurden 3 Replikate jeder Probe analysiert. Es wurden insgesamt 3 Analysen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 2D – Gelelektrophorese

4.1.1 Zellwand – assoziierte Proteine

Bereits 1976 vermutete Bu'Lock zusätzlich zu den bekannten hormonellen Interaktionen spezifische Oberflächenkomponenten, die bei dem Prozess der Fusion der Gametangien beider heterothallischer Partner eine Rolle spielen könnten (Bu'Lock, 1976). In seiner Arbeit untersuchte er die sexuellen Prohormone und Hormone der Mucorales und vermutete für deren Erkennung entsprechende Rezeptoren an der Zellwandoberfläche.

Eine chemische Analyse der Zusammensetzung der Zellwand von *A. coerulea* lieferte erste Hinweise, dass Proteine ca. 5% des Zellwandmaterials ausmachen (Feofilova et al., 1981). Immunologische Studien mit Antikörpern gegen reine Hyphen- und gegen mit Zygothoren durchwachsene Fraktionen von *Mucor mucedo* zeigen tatsächlich Zygothoren-spezifisches Oberflächenmaterial (Jones et al., 1978).

Um dieses genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Dissertation Zellwand – assoziierte Proteine von *Mucor mucedo* isoliert, sowohl von separat angezogenen (-)- und (+)- Kreuzungspartnern als auch von Kreuzkulturen in verschiedenen Entwicklungsstadien. *Mucor mucedo* (-), (+) - und Kreuzkulturen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben angezüchtet und in den zu untersuchenden Stadien geerntet (3.3).

Zur Analyse der Proteine wurde die Methode der 2-D – Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE) mit anschließender Bestimmung der Peptidsequenzen durch MALDI-TOF gewählt. 2-D PAGE hat in den letzten Jahren mit der sich neu entwickelnden Richtung der „Proteomics“ an Bedeutung gewonnen. Die Proteomanalyse ist das direkte Messen von Proteinen in einer Probe zu einer bestimmten Zeit. 2-D PAGE erlaubt die Analyse und Identifizierung von tausenden von Genprodukten mit Softwareprogrammen und Protein- Datenbanken (Heda, 2003).

Die 2-D PAGE wurde wie unter 3.6 – 3.9 beschrieben durchgeführt. Pro Stadium wurden zwei biologische und davon je drei technische Wiederholungen untersucht.

Die in Abbildung 4.1 dargestellten 2-D Gele zeigen das Proteinmuster (Zellwand – assoziierte Proteine) der Kreuzungstypen von *Mucor mucedo* (–), (+) und (+–) in verschiedenen Entwicklungs- und Behandlungsstadien. Die Gele a-c zeigen beide Kreuzungstypen und die Kreuzkultur im unbehandelten Substratmyzelstadium. In diesem Stadium wurden reine Hyphenkulturen untersucht, das heißt, weder sexuelle Strukturen wie Gametangien, Zygothoren oder Zygosporien, noch asexuelle Strukturen wie Sporangien waren ausdifferenziert.

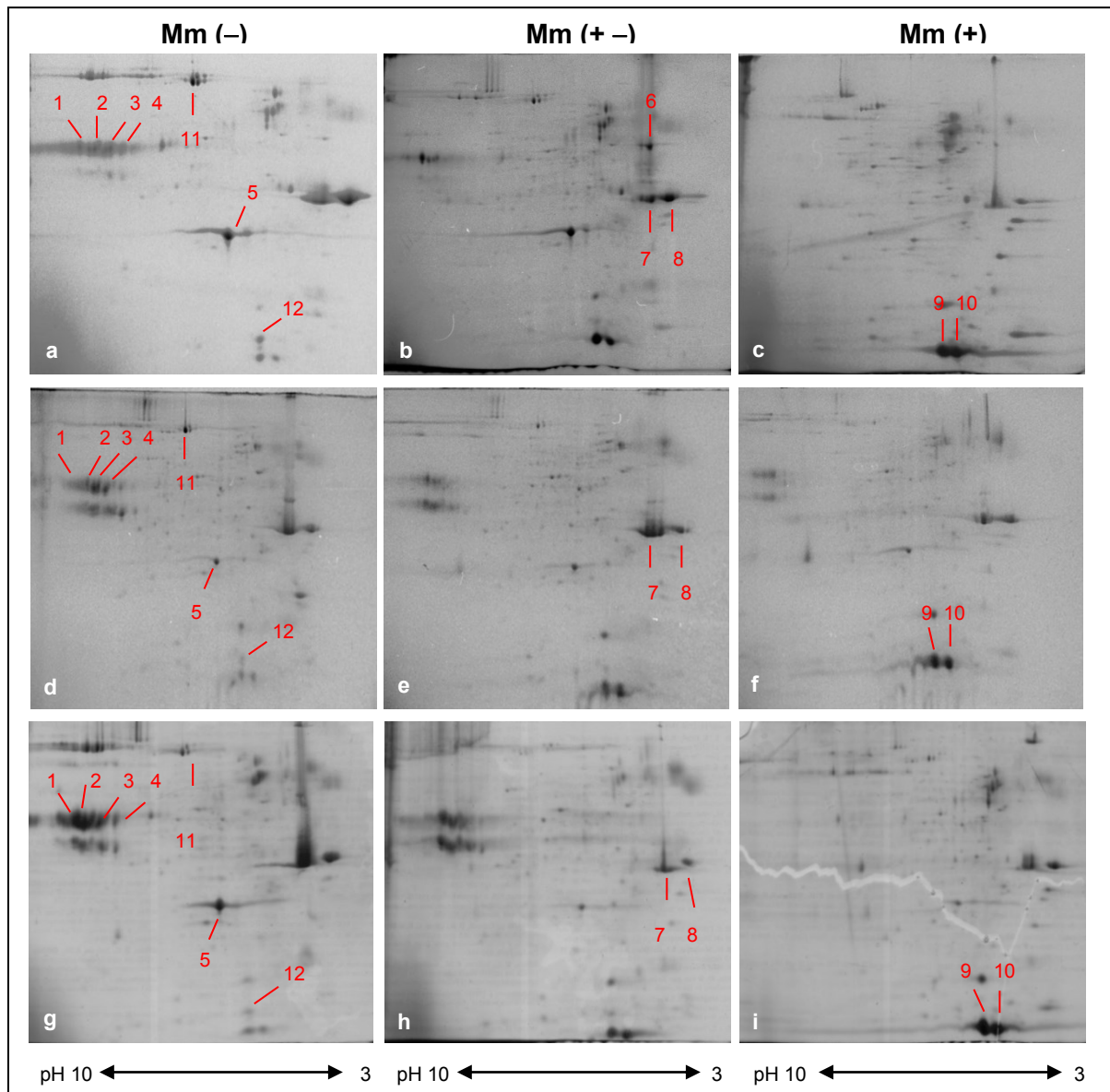


Abbildung 4.1 Zellwand– assoziierte Proteine. Fotos a – c zeigen das Proteinmuster des nicht induzierten Substratmyzels, d – f zeigen das Proteinmuster des TA– induzierten Luftmyzels. g-i zeigen das Proteinmuster des nicht-induzierten Sporangienstadiums (g, i), bzw. des Zygothorenstadiums (h). 1-12: Proteinspots, die aufgrund ihrer differentiellen Expressierung in beiden Kreuzungstypen für die MALDI-TOF Analyse aus dem Gel eluiert wurden. Mm: *Mucor mucedo*

Die Kulturen der Gele d-f waren im Substratmyzelstadium mit Trisporsäure (TA) besprüht und nach 18 Stunden geerntet worden (3.1.1). Hier zeigten sich sowohl in der (-)- als auch in der (+)- Kultur bereits Zygophoren, die jedoch nicht zu Zygosporien heranreifen konnten, da ihnen der entsprechende Kreuzungspartner fehlte. In der TA- induzierten Kreuzkultur waren darüber hinaus auch Zygosporien in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen.

Die Gele h-i zeigen unbehandelte Kulturen, die bis zum Sporangienstadium (g, i) bzw. Zygosporienstadium (h) herangewachsen waren. Sie dienten (ebenso wie die Lösemittelkontrolle, hier nicht dargestellt) als Vergleichskontrolle.

Die Lösemittelkontrolle bestand darin, dass DMSO, in dem bei den TA-induzierten Kulturen die Trisporsäure gelöst war, nun in entsprechend gleicher Menge mit Wasser vermischt und ebenso im Substratmyzelstadium auf die Kulturen gesprüht wurde. Auch sie wurden nach 18 Stunden geerntet.

Bei den Zellwand- assoziierten Oberflächenproteinen sind zwischen dem Substratmyzel-, dem TA- induzierten und dem nicht-induzierten Stadium in keiner der Kulturen wesentliche Unterschiede ersichtlich. Alleine Spot 5 ist im (-)-Kreuzungstyp im TA-induzierten Stadium weniger stark ausgeprägt (vergl. 4.1 a, d). Zwischen den (-) – und (+) – Kulturen jedoch sind deutliche Differenzen zu erkennen, die in Abb. 4.1 markiert sind. Diese Spots wurden ausgeschnitten und wie unter 3.10 – 3.11 beschrieben verdaut und analysiert. Von den ca. 60 abzubildenden Proteinspots sind hier 12 in unterschiedlicher Ausprägung zu sehen. Das entspricht einem Prozentsatz von etwa 20.

In den Kreuzkulturen b, e und h zeigten sich gegenüber den Einzelkulturen keine zusätzlichen Proteinspots. Die Kreuzkulturen erwiesen sich auf der mit der 2-D PAGE – Methode abzubilden möglichen Proteinebene als Mischprodukte der Einzelkulturen. Die nicht abgebildete DMSO Kontrolle zeigte bei *Mucor mucedo* (-), -(+) und der Kreuzkultur das gleiche Proteinmuster.

4.1.2 Zytoplasmatische Proteine

Um zu untersuchen, welche zytoplasmatischen Proteine möglicherweise innerhalb einer Zelle an einer sexuellen Reaktion beteiligt sind, wurde das Zytoplasma ebenfalls mithilfe der 2-D PAGE analysiert.

Für die Analyse der zytoplasmatischen Proteine wurden ebenfalls *Mucor mucedo* (-), (+) - und Kreuzkulturen wie unter 3.1.1 beschrieben angezogen und in den zu untersuchenden Stadien geerntet. Anschließend wurden wie unter 3.6 – 3.9 beschrieben 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt. Auch hier wurden zwei biologische und davon je 3 technische Wiederholungen durchgeführt.

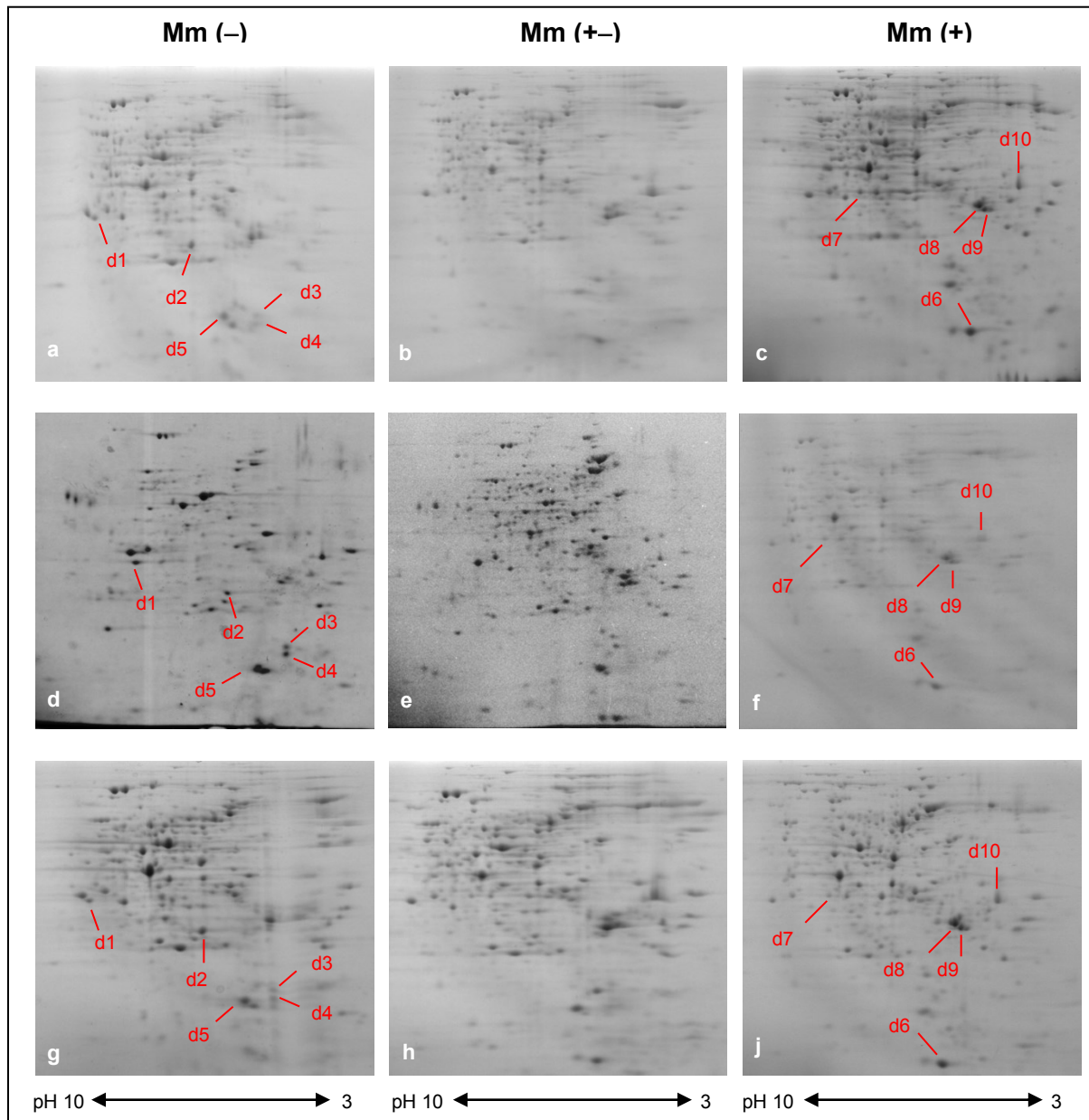


Abbildung 4.2 Cytoplasmatische Proteine. Fotos a – c zeigen das Spotmuster des nicht induzierten Bodenmyzels, d – f zeigen das Spotmuster des TA – induzierten Luftmyzels: Zygothoren im Falle von d -f, im Falle von e waren darüber hinaus Zygothoren sichtbar. Fotos g – i sind nicht – induzierte Kontrollkulturen, auf denen in den (-) und (+) – Kulturen (g, i) Sporangien zu sehen waren, auf der Kreuzkultur (h) auch Zygothoren.

d1-d10: Proteinspots, die aufgrund ihrer differentiellen Expressierung in beiden Kreuzungstypen für die MALDI-TOF Analyse aus dem Gel eluiert wurden. Mm: *Mucor mucedo*

Zur weiteren Analyse für MALDI-TOF wurden nur Proteine ausgewählt, die in jeder Wiederholung auf dem Gel erkennbar waren. Daher erscheinen auf den 2-D PAGE Fotos in Abbildung 4.2 manche Proteinspots, die zwar nur in einem der beiden Kreuzungspartner vorhanden waren, jedoch ließ sich dies bei einer erneuten Wiederholung nicht bestätigen. Aus diesem Grund wurden sie nicht durch MALDI-TOF analysiert, da das Ergebnis der IEF mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung in diesen Fällen nicht eindeutig war.

Die in Abbildung 4.2 dargestellten 2-D Gele zeigen das zytoplasmatische Proteinmuster der (–) und (+) Kreuzungstypen von *Mucor mucedo* sowie Kreuzkulturen in verschiedenen Entwicklungs- und Behandlungsstadien. Die Gele a-c zeigen Einzelkulturen beider Kreuzungstypen und die Kreuzkultur im unbehandelten Substratmyzelstadium. In diesem Stadium wurden erneut reine Hyphenkulturen untersucht, das heißt, weder sexuelle Strukturen wie Gametangien, Zygophoren oder Zygosporien, noch asexuelle Strukturen wie Sporangien waren ausdifferenziert.

Auch für die Analyse der zytoplasmatischen Proteine wurden die *Mucor mucedo* - Kulturen der Gele d-f im Substratmyzelstadium mit Trisporsäure (TA) besprüht und nach 18 Stunden geerntet (3.1.1). Hier zeigten sich erneut sowohl in der (–)- als auch in der (+)- Kultur bereits Zygophoren, die jedoch nicht zu Zygosporien heranreifen konnten, da ihnen der entsprechende Kreuzungspartner fehlte. In allen Kreuzkulturen (b, e, h) waren Zygosporien in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen.

Die Gele h-i zeigen unbehandelte Kulturen, die bis zum Sporangienstadium (g, i) bzw. Zygosporienstadium (h) herangewachsen waren. Sie dienten (ebenso wie die Lösemittelkontrolle, hier nicht dargestellt) als Vergleichskontrolle.

Die Lösemittelkontrolle bestand darin, dass DMSO, in dem bei den TA-induzierten Kulturen die Trisporsäure gelöst war, nun in entsprechend gleicher Menge mit Wasser vermischt und ebenso im Substratmyzelstadium auf die Kulturen gesprüht wurde. Auch sie wurden nach 18 Stunden geerntet.

Zwischen dem Bodenmyzel-, dem TA-induzierten und dem nicht-induzierten Stadium sind in keiner der Kulturen wesentliche Unterschiede ersichtlich. Zwischen den (–) – und (+) – Kulturen jedoch sind sieben Differenzen zu erkennen, die in Abb. 4.2 markiert sind. Diese Spots wurden ausgeschnitten und wie unter 3.10 – 3.11 beschrieben verdaut und analysiert.

In den Kreuzkulturen wurden keine zusätzlichen Proteinpunkte sichtbar. Die nicht abgebildete DMSO Kontrolle zeigte bei *Mucor mucedo* (-), -(+) und der Kreuzkultur das gleiche Proteinmuster.

4.1.2.1 Zytoplasmatische Proteine

Um die Auflösung der Proteine auf den 2D-Gelen zu erhöhen, wurden in Kooperation mit der Aberdeen Fungal Group (Prof. Neil A. R. Gow), School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK, ausgewählte Proben auf IF-Streifen mit einem pH-Gradienten 4-7 aufgetragen. Dies trug wesentlich zu einer Verbesserung der Auftrennung der Proteine bei. Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Proteine in der zweiten Dimension mittels SDS – PAGE aufgetrennt und in einem weiteren Schritt die Peptidsequenzen durch MALDI-TOF ermittelt.

Da bereits durch die vorangegangenen 2-D PAGEs (4.1.1, 4.1.2) geklärt wurde, dass es nur zwischen dem (-) und (+) Kreuzungstyp Unterschiede gibt, nicht aber zwischen verschiedenen Stadien bzw. Kreuzkulturen, wurden hier nur die Einzelkulturen der (-)- und (+)- Kreuzungstypen des Substratmyzels von *Mucor mucedo* erneut untersucht.

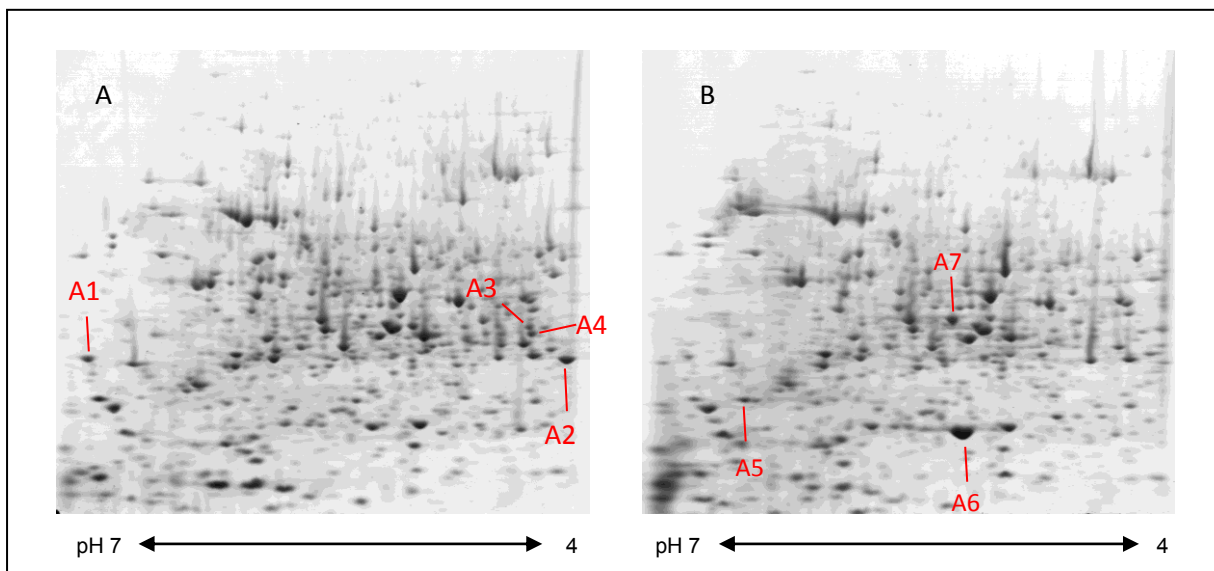


Abb. 4.3 A: *Mucor mucedo* (+) Substratmyzel, B: *Mucor mucedo* (-) Substratmyzel;
A1-A7: Proteinspots, die aufgrund ihrer differentiellen Expressierung in beiden Kreuzungstypen für die MALDI-TOF Analyse aus dem Gel eluiert wurden.

Auch bei einem pH-Bereich von 4-7 zeigt sich, dass es nur wenige Unterschiede im Proteinmuster zwischen *Mucor mucedo* (-) und (+) gibt. Allerdings lassen sich hier nur sieben unterschiedliche Proteinpunkte auszumachen (Abb. 4.3).

4.2 Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteine

Für die Untersuchung der Proteine wurde die Methode des Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) gewählt, die für die Analyse vieler biologischer Moleküle eingesetzt wird. Ausgesuchte Proteine werden mithilfe einer Endoprotease enzymatisch verdaut und in für jede Protease spezifische Peptidsequenzen geschnitten. Bei dieser Methode entsteht so für jedes Protein ein sogenannter Peptidmassen Fingerabdruck (PMF), anhand dessen ein Protein unter optimalen Bedingungen eindeutig identifiziert werden kann. Das Ergebnis jeder Analyse besteht aus einem Spektrum, das die Massen der Peptidfragmente aufzeigt, die im Anschluss daran mit einer Proteindatenbank abgeglichen werden müssen. Um hierbei eindeutige Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig, dass die Proteinsequenzen des zu untersuchenden Organismus in dieser Datenbank gespeichert sind.

Diese Methode hat gegenüber der N-terminalen Sequenzierung den Vorteil, dass ein eventuell durch N-Acetylaminosäuren, glykosylierte Aminosäuren, Pyrrolidongruppen oder ähnliches blockierter N-Terminus keine Rolle spielt (Georghe et al., 1997). Allerdings muss für die Auswertung der Ergebnisse gewährleistet sein, dass eine Datenbank die für den zu untersuchenden Organismus spezifischen Proteinsequenzen enthält. Da die Aminosäurezusammensetzung selbst verwandter Proteine von Organismus zu Organismus variiert und somit die Masse eines jeden Proteins unterschiedlich ist, ist es unerlässlich, dass man den Abgleich mit den Proteinsequenzen des analysierten Organismus durchführt. Sind die Proteinsequenzen jedoch in keiner Datenbank verzeichnet, muss man notwendigerweise auf verwandte Organismen ausweichen, deren Proteinsequenzen sich jedoch teilweise erheblich unterscheiden.

Da von *Mucor mucedo* nur wenige Proteinsequenzen vorhanden sind, wurden für die Analyse der MALDI-TOF Ergebnisse aus diesem Grund die Proteome der verwandten Zygomyceten *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeana* und *Rhizopus oryzae* für einen Massenabgleich herangezogen. Die Proteinsequenzen von *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeana* wurden vom DOE Joint

Nummer des Spots auf Gel	Spotbezeichnung	Proteinname	Organismus	Signifikanz	NCBI Blast	Peptidsequenz
1	z1	Zink finger/ FYV E family	Phybl	32,9	FYVE superfamily/vacuolar sorting associated protein	HSANQLPLFSYDSPCWEWS RVCDACF
2	2 Zellw	Leucine-rich repeat	Mucci	22,1	predicted protein/Leucine rich repeat	GFEMELCKQALQQNATLED
3	3 Zellw	hypothetical protein	Ro	31	peroxisomal membrane protein pex 16	NASQITSIETSLR, TEDKPILSMVSTSQIR
3	z3	hypothetical protein	Ro	12	NADB_Rossmann superfamily/UDP-glucuronic acid decarboxylase	DMVLTAPLSSSQHGVVDVVTLP AVK
4	4 Zellw	hypothetical protein	Ro	33	predicted: similar to transposon-like	ITWGGGGAMVWEEIPDL
5	5 Zellw	no name given	Phybl	33	hypothetical protein	SIDCDAILFDILLFIDLLMRI
6	6 Zellw	Zn-finger	Phybl	39	large repetitive protein/DNA-repair	FVQYFETNWCMTMTKYCVWK FYFKEES
8	z8	G-protein beta WD-40 repeat	Phybl	38	WD40 superfamily/hypothetical protein	TLVAVGGDGYLSTWDIRKPNV AAMSDQMGEDELLSVK
9	9 Zellw	predicted protein	Ro	33	hypothetical protein	LAELGDLEVLVLETAGAFGN DD HAKESFDNSK
9	z9	hypothetical protein	Ro	26,9	MAPEG superfamily/microsomal glutathione S-transferase	MGALIIPSEYGYVLAVATLSV LHLVTLTIK
10	10 Zellw	transposon protein	Phybl	30	hypothetical protein	NLVAAPKQATTIKEKYFCTQ QEACRKDMK
10	z10	hypothetical protein/iboflavin aldehyd-forming enzyme	Phybl	32	hypothetical protein/iboflavin aldehyd-forming enzyme	MLGIQFR, GDE GVVK, VC GDLGR
11	11 Zellw	hypothetical Protein	Phybl	36	hypothetical protein	SGSDLVLGFNSVMGAT

Tab. 4.1 Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse der **Zellwand- assoziierten** Proteine.

Abk.: Phybl: *Phycomyces blakesleeanus*, Mucci: *Mucor circinelloides*, Ro: *Rhizopus oryzae*

Genome Institute, CA, USA zur Verfügung gestellt, die Sequenzen von *Rhizopus oryzae* vom Broad Institute of MIT and Harvard, MA, USA. Die Sequenzen wurden in die lokale MASCOT-Datenbank des Hans-Knöll Instituts in Jena eingespeist und daraus der Abgleich der aus der MALDI-TOF Analyse gewonnen Peptidmassen mit den Proteinsequenzen durchgeführt. Zunächst wurden die in Kap. 4.1 beschriebenen Proteine aus den Gelen isoliert (3.10) und für die Analyse mit MALDI-TOF vorbereitet. Pro Proteinspot wurden zwei MALDI-TOF Analysen durchgeführt. Der Abgleich mit den Sequenzen der verwandten Zygomyceten erwies sich als schwierig, da die Übereinstimmung in den Proteinsequenzen nur bei ca. 70% liegt. Dies konnte anhand der wenigen vorhandenen *Mucor mucedo* Proteinsequenzen mithilfe der NCBI-Datenbank ermittelt werden. Daher wurden nur wenige signifikante Übereinstimmungen gefunden. Bei den nicht-signifikanten Ergebnissen wurden die MASCOT-Ergebnisse (Masse des Gesamtproteins, pH-Wert) mit den auf den 2-D Gelen zu sehenden Proteinen verglichen. Befand sich dort ein untersuchtes Protein annähernd in der Position der durch MASCOT ermittelten Masse und des pH-Wertes wie das durch den Datenbankabgleich gefundene Protein, so wurde es in die oben, bzw. unten stehenden Tabellen aufgenommen und für die weiteren Untersuchungen in dieser Dissertation verwendet.

Für die analysierten Proteinpunkte wurden die in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 aufgeführten Übereinstimmungen gefunden.

Bei den Zellwand-assoziierten Proteinen in Tabelle 4.1 wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt. Daher wurde das oben beschriebene Verfahren benutzt, bei dem die aus der MASCOT-Analyse ermittelten pH- Werte und Gesamtproteinmassen der einzelnen Proteine mit den IEF- und Größenpositionen der Proteine auf den 2-D Gelen abgeglichen wurden. Diejenigen Proteine mit den größten Übereinstimmungen zwischen diesen Vergleichsparametern wurden ausgewählt und in die Tabellen 4.1 und 4.2 aufgenommen. Aus diesem Grund finden sich für manche Zellwand-assoziierten Proteine (Nummern 3, 9, 10) zwei Aufführungen in Tabelle 4.1. Sie stammen aus zwei getrennten MALDI-TOF Analysen derselben Proteinspots 3, 9 und 10 auf den Gelen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen waren in diesen Fällen zwar unterschiedlich, d.h. die erhaltenden Peptidsequenzen waren nicht dieselben, jedoch ergab ein Vergleich der IEF-Werte und Gesamtproteinmassen eine ungefähre Übereinstimmung zwischen den MASCOT-

Nummer des Spots auf Gel	Spotbezeichnung	Proteinname	Organismus	Signifikanz	NCBI Blast	Peptidsequenz
3	d3	signalosome complex subunit/JUN kinase	Phybl	31	Mov34 superfamily/ signalosome/ JUN kinase	MGGYYGDRK, ACGCRPK
5	d5	hypothetical protein	Phybl	57	protein transport protein	MSLGLGQLFY VLLCFINAVA VLSEDR, SKMVNLISAV RTLMRIPLIA INIIVIYEI ILG
6	d6	predicted protein	Mucci	34	RNAse_H2_Ydr279 superfamily/predicted protein	ALPILDEAYK, THPDE AFLDTPAK
7	d7	hypothetical protein	Ro	38	Ras-like-GTPase superfamily	GSFPTTQYIPTIFETAVKDM TVDSR
9	d9	predicted protein	Ro	51	no match	MGPGEDDR, LEYGPEGYL T LSGGR
10	d10	stomatin	Phybl	36	stomatin-like	MGRFHRMLEPGLNILIPII DRIK
A2	A2	Malate dehydrogenase	Mucci	478	Malate dehydrogenase	LGAAGGIGQPPLSLLKEN PHVTHLSLYDIV
A3	A3	Malate dehydrogenase	Mucci	143	Malate dehydrogenase	GAAGGIGQPPLSLLKQS ELITHLSLYD
A4	A4	Acyl-CoA dehydrogenase	Mucci	79	glutaryl-CoA dehydrogenase	WEDPLNLEKLLTEDEFV RDAARSYCQERLLPR
A7	A7	S-adenosylmethionine synthetase	Mucci	282	S-adenosylmethionine synthetase	TAAKTGMIMVFGIITTKA NLDYQKIIRNAIKQIG

Tab. 4.2 Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse der **zytoplasmatischen** Proteine.

Abk.: Phybl: *Phycomyces blakesleeanus*, Mucci: *Mucor circinelloides*, Ro: *Rhizopus oryzae*

rot markierte Zahlen: MASCOT-Analyse ist signifikant

mit „A“ bezeichnete Proteine stammen aus der Analyse der Aberdeen Fungal Group. Vergl. 2-D PAGEs Abb. 4.3 A, B. Für die Proteine A1, A5 und A6 wurden keine Übereinstimmungen mit der Datenbank gefunden.

Datenbankabgleichen und den auf den Gelen zu beobachtenden Positionen der Proteine. Bei den zytoplasmatischen Proteinen (Tab. 4.2) fanden sich sechs signifikante und vier nicht-signifikante Ergebnisse, bei denen wiederum die IEF-Werte und die Gesamtproteinmassen verglichen wurden. Auch hier wurden die Proteine mit der größten Übereinstimmungen in diesen Parametern weiter verfolgt.

4.3 Weitere Analysen der einzelnen Proteinspots

Für eine molekulare Untersuchung der durch die MALDI-TOF Analyse ermittelten Proteine wurden die Sequenzen der Proteinpunkte der Tabellen 4.1 und 4.2 mit den entsprechenden Proteinsequenzen von *Phycomyces blakesleeana*, *Mucor circinelloides* bzw. *Rhizopus oryzae* abgeglichen. Um die tatsächlichen DNA-Sequenzen von *Mucor mucedo* durch eine PCR zu erhalten, wurden degenerierte Primer dabei so konstruiert, dass sie durch konservierte Regionen der im folgenden aufgeführten Proteinsequenzen führen. Durch die Verwendung konservierter Regionen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA-Sequenz von *Mucor mucedo* an genau diesen Stellen gleich, bzw. mit geringer Abweichung verläuft. Dies ist unerlässlich für die Funktionstüchtigkeit der Primer.

Mithilfe der konstruierten degenerierten Primer wurden für die nachfolgenden Sequenzen PCR-Produkte amplifiziert, die aus den Agarosegelen isoliert und in einen Vektor kloniert wurden. Im Anschluss daran wurde das DNA-Produkt sequenziert.

4.3.1 z1: Zink- Finger, FYVE- Familie

Die beim MASCOT-Datenbankabgleich gefundene Sequenz für „Zink- Finger“ wurde in die NCBI-Datenbank eingegeben und mit den dort enthaltenen Proteinsequenzen verglichen (Tab. 4.1). Daraus ergab sich eine Übereinstimmung mit „FYVE superfamily/vacuolar sorting associated protein“.

FYVE Proteine werden mit Funktionen assoziiert, die mit endosomalem Transport in Verbindung stehen (Petiot et al., 2003). FYVE-Domänen stellten sich als Membran-anstrebende Domänen heraus, die hochspezifisch für Phosphatidylinositol 3-Phosphat sind. Sie werden hauptsächlich in Proteinen der Transportwege gefunden (Wywiał et al., 2010).

4.3.1.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „z1“- Proteinsequenz (Peptidsequenz vergl. Tab. 4.1) von *Phycomyces blakesleeenanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden der Aminosäuresequenz nach passend aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das gewünschte Fragment zu amplifizieren.

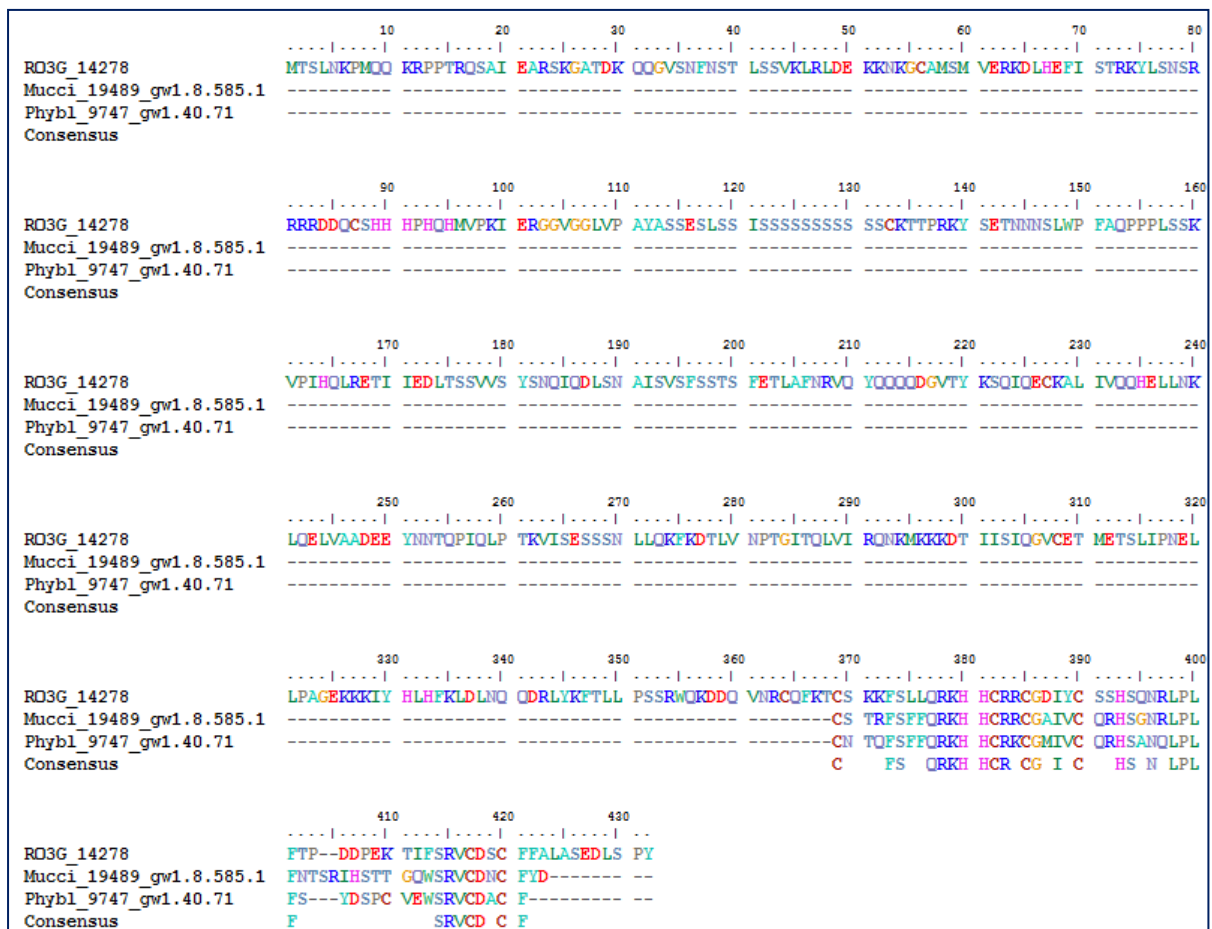


Abb. 4.4 Proteinsequenzen für z1 (vacuolar sorting-associated protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).

Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass die Konsensussequenz nicht lang genug ist, um funktionierende degenerierte Primer zu konstruieren. Alleine die Aminosäuren Arginin (R) und Leucin (L) haben aufgrund des redundanten genetischen Codes sechs verschiedene DNA-Triplet-Möglichkeiten. Durch die hohen Variationsmöglichkeiten an diesen Proteinpositionen ist es unmöglich, funktionierende degenerierte Primer herzustellen, die ein spezifisches Produkt liefern. Es muss davon ausgegangen werden, dass solche Primer ebenso an

weiteren Stellen in der DNA-Sequenz binden und ein oder mehrere unspezifische DNA-Produkte amplifizieren. Aus diesem Grund war es nicht möglich, entsprechende Primer zu konstruieren und das Proteinprodukt, bzw. DNA-Produkt in dieser Dissertation weiter zu behandeln.

4.3.2 2 Zellw: Leucine-rich repeat

Leucine-rich repeats sind kurze Sequenzmotive, die in verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen und zellulären Lokalisationen vorhanden sind. Vermutlich sind alle Proteine, die solche Sequenzmotive besitzen, an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Kobe et al., 1994).

4.3.2.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „2 Zellw“- Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeenanus* abgeglichen. Der Datenbankabgleich der *Mucor circinelloides*- Sequenz mit *Rhizopus oryzae* erbrachte keine Übereinstimmung, daher wurden nur die Proteinsequenzen von *Phycomyces*

	10	20	30	40	50	60	70	80
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	MATNDSHLY	LLGLGDFDL	CVSALSHTQ	IEDATNWILA	QSKPLEAIGQ	TLKSDTSANT	SSEPLSWQTH	SNSSLSVNEE
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	MTLNDSNLY	LLGLGFEMEL	CKQALQONAT	LEDATFWILN	PSRPPTSPVS	KLDFSRPISS	SSTFTSQPKI	STEKRKQDDQ
Consensus	M NDS LAY	LLGLGF L C AL		EDAT WIL S P		L SS		S
	90	100	110	120	130	140	150	160
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	VPKDMSQNI	SSKMAIQARK	EKQSEKQARE	RALQAIKEDQ	EDRKLRRAHL	LEKSPKIDAP	PQQASGSNRS	PELLRHQKEI
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	VTKOMKKKF	D-RIANDLKK	ERIAEREARR	RALIDIKEDR	ESRKLK-GHT	TTKPDTRQAR	QSPATSTSKP	----ESDKDQ
Consensus	V KDM	A K E E AR	RAL IKED	E RKL R H	K A A			K
	170	180	190	200	210	220	230	240
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	KAKKLLDNEA	KKRALENIKQ	DREAKKSPAS	SIQPKPITSR	PQPTVNPSAS	ALIQIRASDG	SSYRKSPFSN	TPFSNVFVW
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	PAFIQPFHDT	KMKCVLEPVK	EKESKTPNAT	LDNISLISTY	PKRIYTVQDA	ALDMKEAG--	-----	
Consensus	A K	E K A	I P		AL A			
	250	260	270	280	290	300	310	320
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	LDQERKFYRQ	ILPQECVTLV	SIYREGEWTR	AIEYRFPVNV	SLHLLRTIP-	TPPEPEREP	EPALPALEQ	EQNQEFGHVL
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1		-----	-----	FLPNV	TLNINIAAPV	IEPQEQEAP	AAMMEEEED	SDSMEDNIN
Consensus				F PNV L	P	P E E E P	E E	V
	330	340	350	360	370	380	390	400
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	EQDEHEMENQ	DS--DEDED	EDMTLPRLGL	AQIRMDYWAN	TLGGNRLVDP	TESVDEVMEG	AQGIGPEEST	AEVQVSTNIP
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	SSEDEVNED	DIGAMDLDVI	RAMPDRPPV	HNVR-IWCR	VGAGHHLTDP	SPIVNTSEIV	ETAAAEPEPSA	NADQEMNQ
Consensus	EDE E D	D D M R	R W	G LDP	V		E S Q N	
	410	420	430	440	450	460	470	480
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	SQRDHRLNAI	LSRNSAASAS	GDNLILRGGQ	GKARDVRCLEK	DICSSMVAGL	ITQPTTEARN	VFKKLMFVSP	DVSSSLVAHL
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	-RRSNILSAM	QRASAHATAT	NIP--SHQQH	ALERHTTSLR	ETCSKAVAGL	LSQHSLSQNS	YLNILDSVSS	EVAESLLEYL
Consensus	R L A	R SA A	NIP--	Q R L	ES VAGL	Q	K L VS	V SL L
	490	500	510	520	530	540	550	560
Phybl_63703_fgenesHB_pg.7_40	ISSRKFLRLK	TPITYTTLES	RYSYLQQAII	DSYIFTTDSL	LEGLSVSNSSA	VSLVKLSIRG	CDVVTAGIY	YLGKLRLEY
Mucci_77005_fgenesHB_pg.1_#_1	VKSGKLN---	TTMRKLA	DHCYLQNIKL	DSYTYCTDSL	IGDLARSNST	ISVTKLSLRG	C-----	LKNLGY
Consensus	S K	T T	YLQ L	DSY TDSL	L SNS	S KLS RG	C	LK L Y

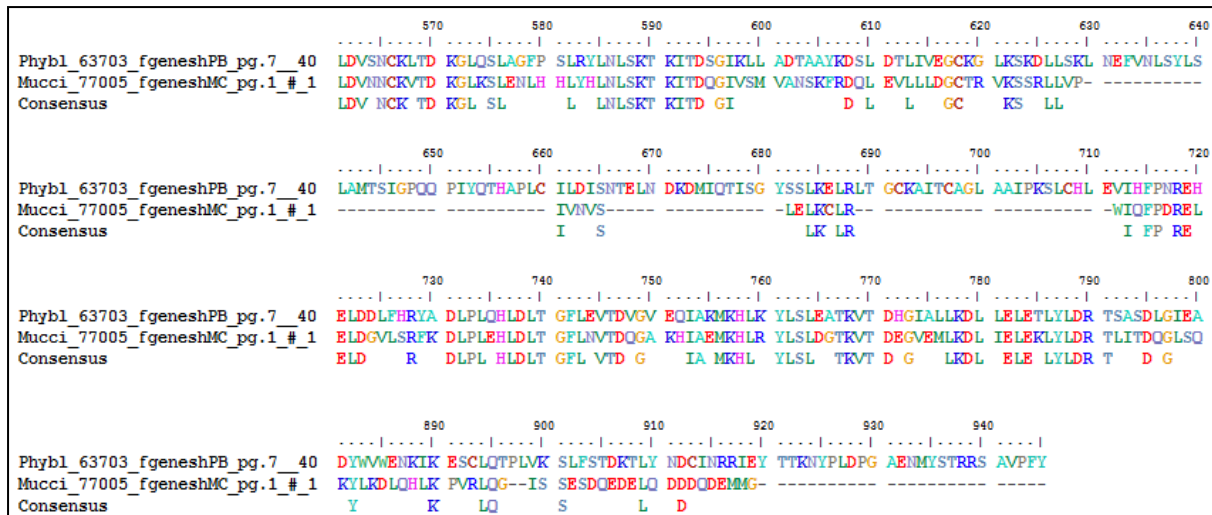


Abb. 4.5 Proteinsequenzen für 2 Zellw (Leucin-rich repeat) von *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl) und *Mucor circinelloides* (Mucci).

blakesleeanus und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese zwei Sequenzen wurden wie zuvor aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das entsprechende DNA-Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.5).

Auch hier war die Konsensussequenz der konservierten Regionen nicht lang genug, um degenerierte Primer zu konstruieren.

4.3.3 3 Zellw: hypothetical protein

Die bei der MASCOT-Datenbanksuche gefundene Proteinsequenz „hypothetical protein“ wurde ebenfalls mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Dabei wurde eine Übereinstimmung mit „peroxisomal membrane protein pex16“ gefunden.

Peroxisome sind ubiquitäre, Membran- gebundene Organellen, die unter anderem bei der Oxidation von Fettsäuren und Cholesterol und bei der Umwandlung von Wasserstoffperoxid in nicht toxische Formen eine Rolle spielen (Wanders, 2004). Genetische- und Proteomstudien in Hefen und tierischen Zellsystemen haben 32 Proteine identifiziert, die bei der Peroxisomsynthese eine Rolle spielen, unter anderem pex16. Dieses ist am peroxisomalen Membranproteinimport beteiligt (Schäfer et al., 2004).

4.3.3.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „3 Zellw“- Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteomen von *Phycomyces blakesleeanus* und *Mucor circinelloides* verglichen.

Wiederum wurden diese drei Sequenzen übereinandergelegt und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

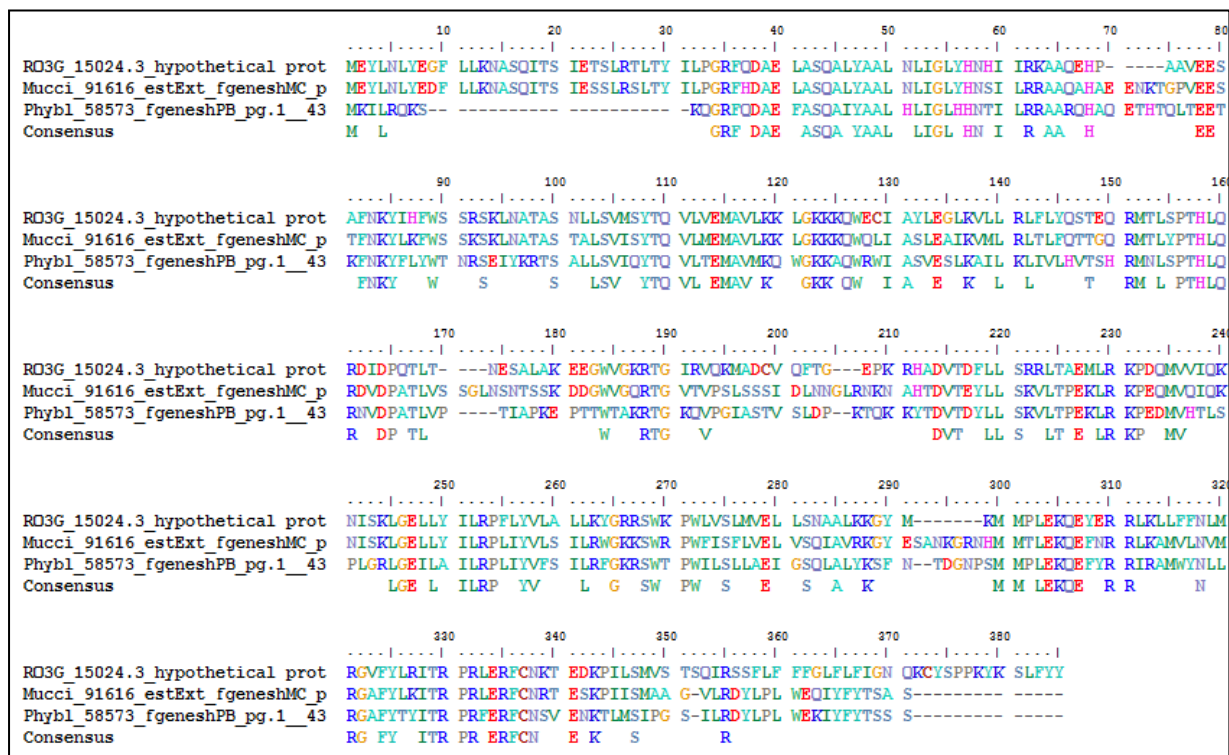


Abb. 4.6 Proteinsequenzen für 3 Zellw (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeana* (Phybl).

Obwohl die Konsensussequenz des Proteins „3 Zellw“, hypothetical protein relativ lang ist, konnten auch hier keine degenerierten Primer konstruiert werden (Abb. 4.6). Die Tatsache, dass die konservierten Regionen immer wieder durch eine oder zwei nicht-konservierte Aminosäuren unterbrochen sind, macht es hier unmöglich, längere Proteinsequenzen zu finden, die für eine Konstruktion der Primer in Frage kämen.

4.3.4 z3: hypothetical protein

Die Proteinsequenz von „hypothetical protein“ wurde ebenfalls mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Dabei wurde eine Übereinstimmung mit „UDP-glucuronic acid decarboxylase/NADB Rossmann superfamily“ gefunden.

UDP-Glucuronsäure Decarboxylase ist für die Umwandlung von UDP-Glucuronsäure zu UDP-Xylose verantwortlich. UDP-Xylose ist ein Zuckerdonor, der wichtig für die Synthese verschiedener Glycoconjugate wie Proteoglycane ist (Bar-Peled, 2001).

4.3.4.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „z3“- Proteinsequenz (vergl. Tab. 4.1) von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteomen von *Phycomyces blakesleeanus* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Wieder wurden alle drei Poteinsequenzen aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

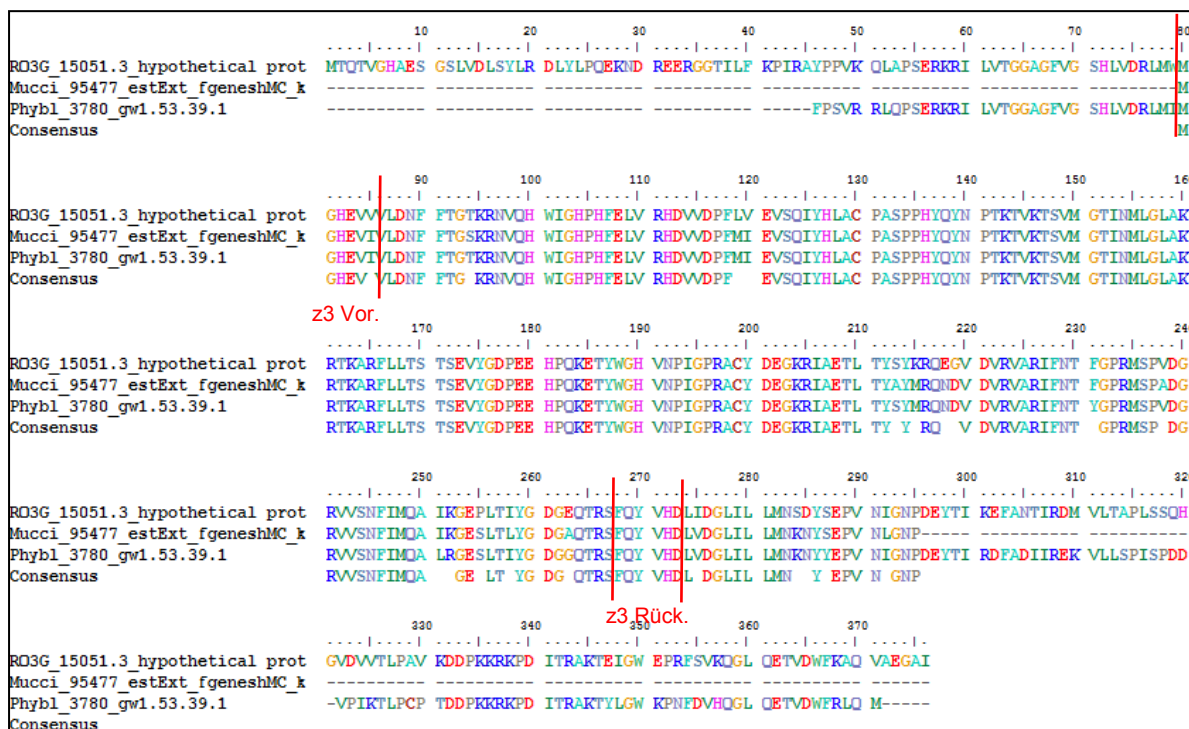


Abb. 4.7 Proteinsequenzen für z3 (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl). z3 Vor.: Vorwärtsprimer, z3 Rück.: Rückwärtsprimer

Hier wurden in den markierten Regionen (Abb. 4.7) degenerierte Vorwärts- und Rückwärts-Primer konstruiert, um das Fragment zu amplifizieren. Die Sequenzen der z3 Vorwärts,- bzw. Rückwärtsprimer sind unter 2.5.1 aufgelistet.

4.3.4.2 Amplifikation des DNA- Fragments z3

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 30 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-), bzw. (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Die Größe des berechneten Fragments beträgt für *Phycomyces blakesleeanus* 770 bp, für *Mucor circinelloides* 760 bp und für *Rhizopus oryzae* 666 bp. Da die genaue Sequenz dieses Fragments für *Mucor mucedo* noch nicht bekannt ist, wird sich dessen Größe vermutlich in einem Rahmen zwischen 666 und 770 bp bewegen.

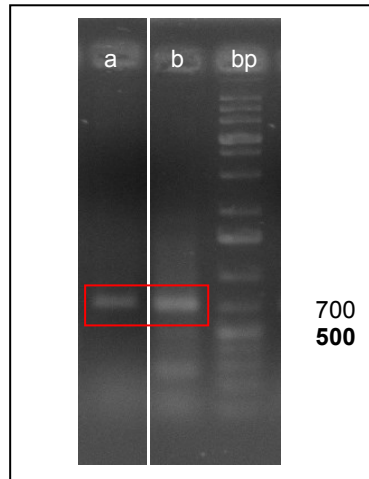


Abb. 4.8 a: Markierung: z3- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (+), b: Markierung: z3- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (-)

Das amplifizierte PCR- Fragment z3 befindet sich auf dem Agarosegel ein wenig oberhalb der 700 bp- Bande des kb- Leiters (Abb. 4.8). Im *Mucor mucedo* (+)- Ansatz sind keine weiteren PCR-Produkte zu erkennen, im *Mucor mucedo* (-)- jedoch ein schwacher Bandenschmier ober- und unterhalb des erwarteten Fragments. Die markierten Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Agarosegel isoliert (3.14). Jedes der PCR –Fragments enthält durch entsprechend gewählte Primersequenzen an seinem 5' Ende eine EcoRI- und an seinem 3' Ende eine PstI-Sequenz, die es erleichtern, das Fragment in einen Vektor zu klonieren.

Der hier verwendete Vektor ist pTZ19R. Der Vektor wurde mit EcoRI und PstI verdaut und auf ein 1,5% Agarose-Gel (1% TAE) aufgetragen. Dadurch wurde das herausgeschnittene DNA-Stück der Multiple Cloning Site vom übrigen Vektor getrennt, der wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel aufgereinigt wurde und anschließend zur Klonierung der PCR-Fragmente diente. Diese Methode wurde auch bei den folgenden Klonierungen angewandt.

Das aus dem Agarosegel gereinigte PCR- Fragment wurde in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden sechs *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurde das präparierte Plasmid, in dem sich nun das z3- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das z3- Insert befand. In Abb. 4.9 ist ersichtlich,

dass eine der Kolonien ein Plasmid mit einem z3- Insert der richtigen Größe enthält. Für das aus dem Gel isolierten (-)- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R nicht erfolgreich. Nur bei dem isolierten (+) Fragment fanden sich im anschließenden Plasmidverdau ein positiver Klon: z3(+)⁵. In einem nächsten Schritt sollte das Plasmid mit dem z3- Inserts sequenziert werden.

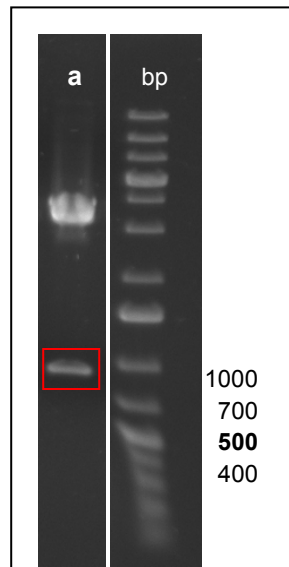


Abb. 4.9 a: Markierung: Klon z3(+)⁵

4.3.5 4 Zellw: hypothetical protein

Ein Abgleich dieser Proteinsequenz mit der NCBI-Datenbank ergab „predicted: similar to transposon-like“. Ein Transposon ist ein genetisches Element, das die Fähigkeit besitzt, sich von einer Stelle auf dem Chromosom zu einer anderen zu transponieren. Es trägt außer den an der Transposition beteiligten Gene weitere, wie zum Beispiel Antibiotikaresistenzen (aus: Brock, Mikrobiologie, 11. Auflage, 2009).

4.3.5.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „4 Zellw“- Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteomen von *Phycomyces blakesleeenanus* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Auch diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

Auch hier konnten nicht genug Übereinstimmungen in der Konsensussequenz gefunden werden, um degenerierte Primer zu konstruieren (vergl. Abb. 4.10). Da es

nicht möglich war, für diese Proteinsequenz degenerierte Primer zu konstruieren, wurde diese Sequenz im Folgenden nicht weiter untersucht.

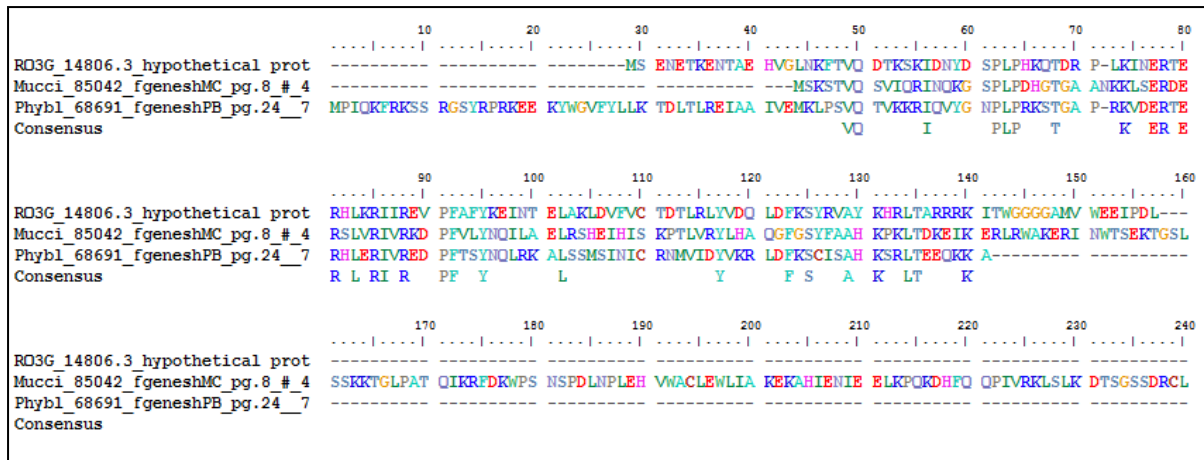


Abb. 4.10 Proteinsequenzen für 4 Zellw (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).

4.3.6 5 Zellw: no name given

Der NCBI-Datenbankabgleich für diese Proteinsequenz ergab nur ein hypothetisches Protein, das nicht näher bekannt und untersucht worden ist.

4.3.6.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „5 Zellw“- Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeenanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten

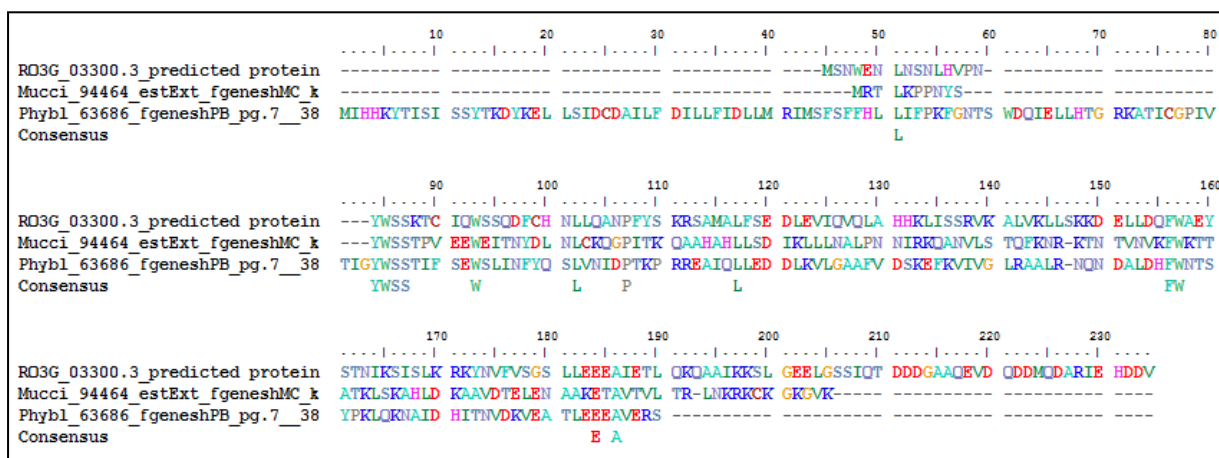


Abb. 4.11 Proteinsequenzen für 5 Zellw (no name given) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).

Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren. Es konnten keine übereinstimmende Regionen im „5 Zellw“- Fragment gefunden werden, um degenerierte Primer zu konstruieren (Abb. 4.11). Infolgedessen konnte auch diese Sequenz in der vorliegenden Dissertation nicht weiter untersucht werden.

4.3.7 6 Zellw: Zn-finger

Ein Abgleich mit der NCBI-Datenbank ergab für die Zinkfinger-Sequenz eine Übereinstimmung mit „large repetitive protein/DNA-repair“.

Ein Zinkfinger ist ein regulatorisches Protein, das häufig bei Eukaryoten auftritt. Es bindet ein Zinkion, während ein Teil des Fingers eine α -Helix bildet, mit deren Erkennungshelices es mit der DNA in Wechselwirkung tritt (aus: Brock, Mikrobiologie, 11. Auflage, 2009). Viele der Proteine, die an DNA-Reparatur beteiligt sind, besitzen einen Zinkfinger.

4.3.7.1 Konstruktion der Primer

Die komplette „6 Zellw“- Proteinsequenz (siehe Tab. 4.1) von *Phycomyces blakesleeenanus* wurde mit den Proteinsequenzen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. In diesem Fall war es nicht möglich, übereinstimmende Sequenzen von *Mucor circinelloides* zu finden. Es wurden beide Proteinsequenzen aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das Fragment zu amplifizieren. Die erhaltene Sequenz von *Rhizopus oryzae* ist nur in wenigen Stellen mit der Sequenz von *Phycomyces blakesleeenanus* übereinstimmend, weshalb es nicht möglich war, konservierte Regionen zu finden und degenerierte Primer zu konstruieren (Abb. 4.12).

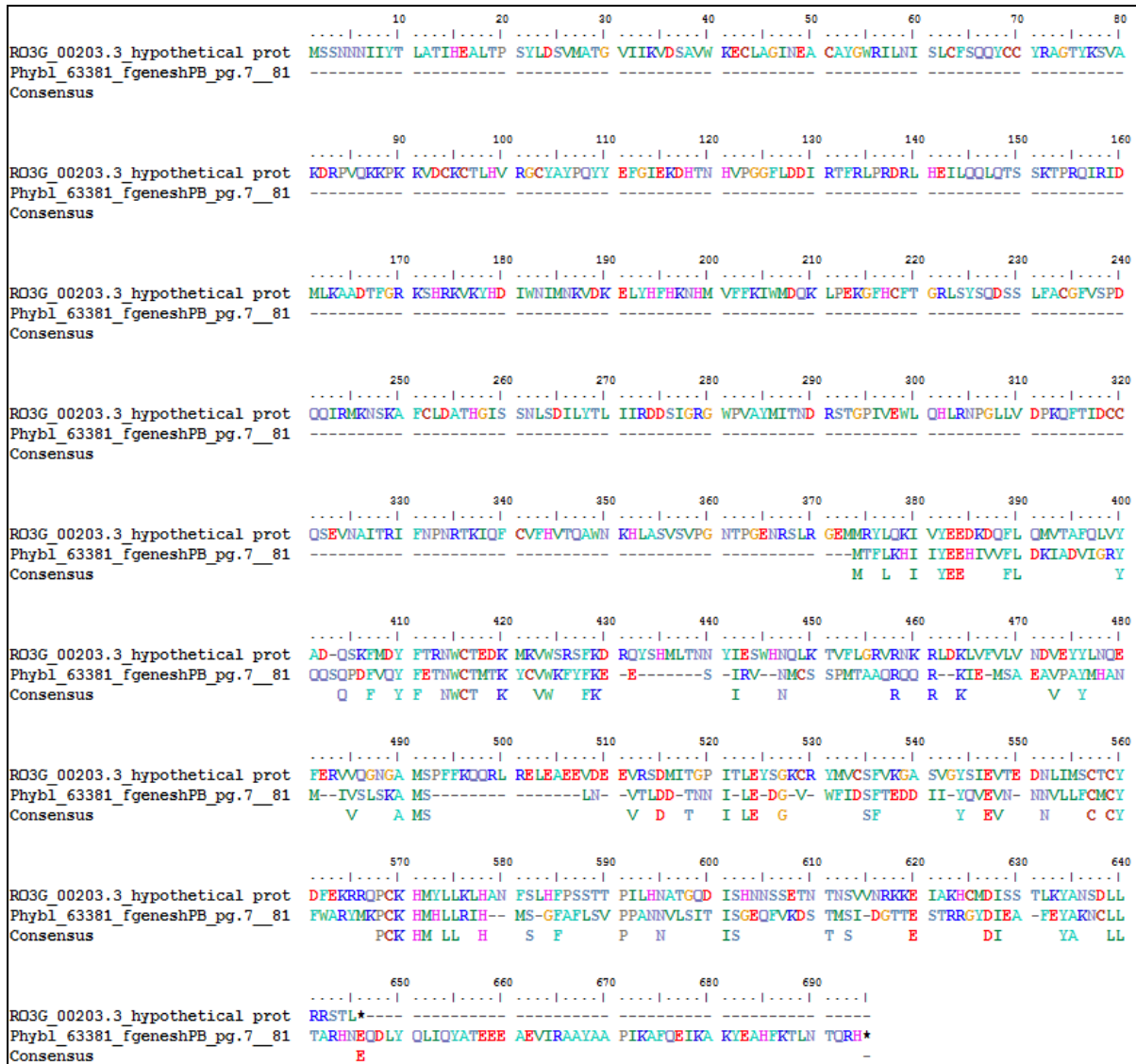


Abb. 4.12 Proteinsequenzen für 6 Zellw (Zn-finger) von *Rhizopus oryzae* (RO), und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).

4.3.8 z8: G-protein beta WD-40 repeat

WD Proteine bestehen aus hochkonservierten, sich wiederholenden Einheiten, die meistens mit Trp-Asp (WD) enden. Sie sind in allen Eukaryoten zu finden, jedoch nicht in Prokaryoten. Sie regulieren zelluläre Funktionen wie Zellteilung, Transkription, Transmembran Signalisierung, mRNA-Modifikation und Vesikelfusion (Neer et al., 1994).

4.3.8.1 Konstruktion der Primer

Die komplette „z8“- Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeenanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese erhaltenen drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen

gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

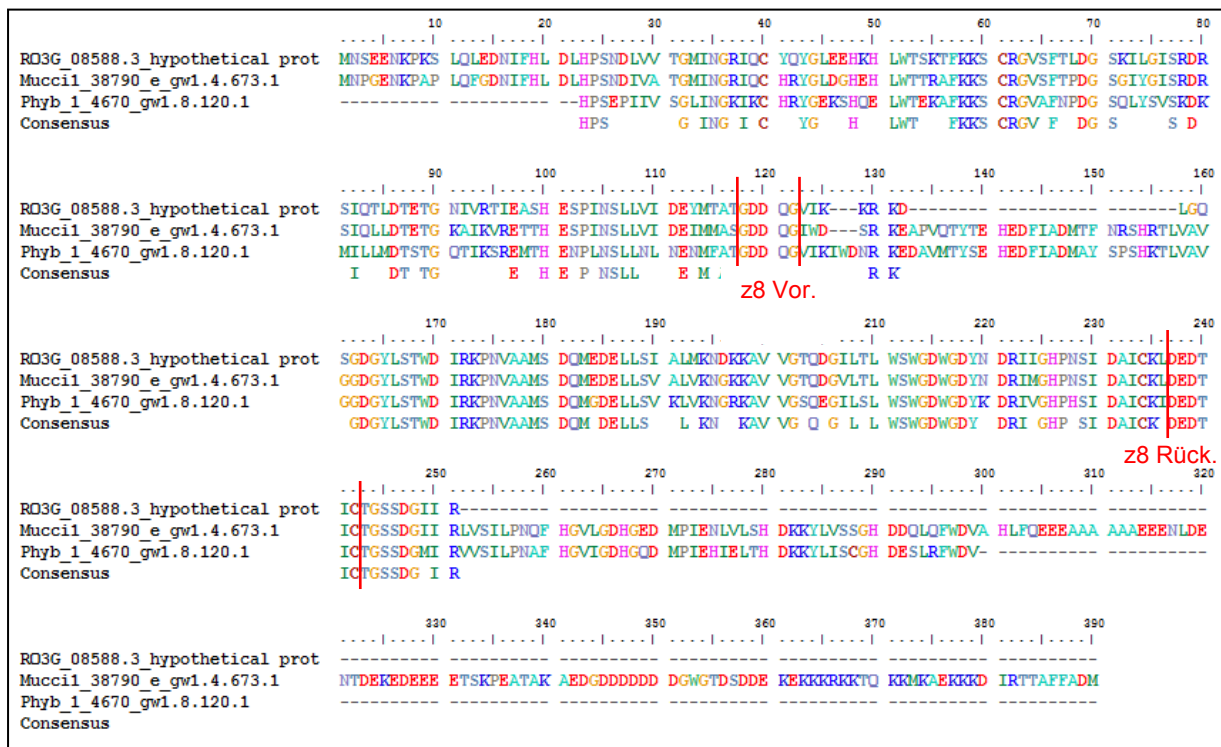


Abb. 4.13 Proteinsequenzen für z8 (G-protein beta WD-40 repeat) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeanus* (Phyb).). z8 Vor.: Vorwärtsprimer, z8 Rück: Rückwärtsprimer

Hier wurden in den markierten Regionen degenerierte Vorwärts- und Rückwärts-Primer konstruiert, um das z8- Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.13). Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.8.2 Amplifikation des DNA- Fragments z8

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat bei *Mucor circinelloides* eine kalkulierte Größe von 413 bp, bei *Rhizopus oryzae* von 404 bp und bei *Phycomyces blakesleeanus* eine Größe von 405 bp. Die für *Mucor mucedo* zu erwartende Bande sollte sich daher ebenfalls in dieser Größenordnung bewegen. Auf Abb. 4.14 sind in jeder Spur zwei Banden ersichtlich. Die kräftigere Bande verläuft jedoch bei ca. 800 bp und ist somit zu groß für das erwartete Fragment. Daher wurde

die untere Bande aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

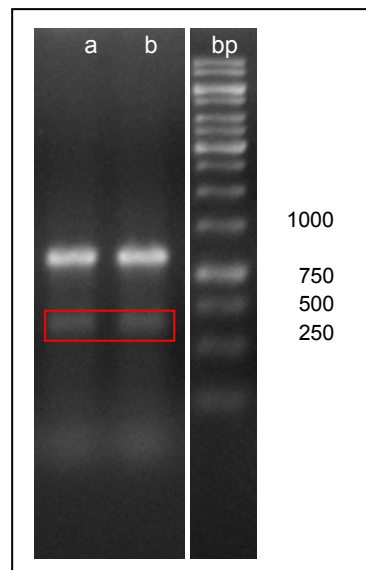


Abb. 4.14 a: Markierung: z8- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (-), b: Markierung: z8- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (+)

Das aus dem Agarosegel gereinigte PCR- Fragment wurde in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden sechs *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurde das präparierte Plasmid, in dem sich nun das z8- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das z8- Insert befand. In Abb. 4.15 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem z8- Insert der richtigen Größe enthalten. Für das aus dem Gel isolierten (+)- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R nicht erfolgreich. Nur bei dem isolierten (-)- Fragment fanden sich im anschließenden Plasmidverdau zwei positive Klone: z8(-)1 und z8(-)2. Allerdings befindet sich bei z8(-)1 das Insert leicht oberhalb des anderen Insert z8(-)2. In einem nächsten Schritt sollten beide Plasmide mit z8- Inserts sequenziert werden.

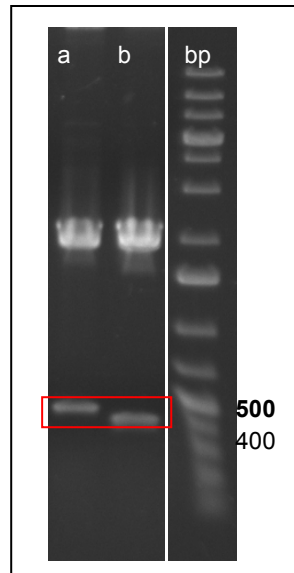


Abb. 4.15 a: Markierung: Klon z8-1, b: Markierung: Klon z8-2

4.3.9 9 Zellw: predicted protein

Ein Abgleich mit NCBI-Datenbank ergab eine Übereinstimmung dieser Proteinsequenz mit „hypothetical protein“. Näheres zu diesem Protein ist nicht bekannt.

4.3.9.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige „9 Zellw“- Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteinsequenzen von *Phycomyces blakesleeana* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

Aufgrund der geringen Übereinstimmung zwischen den Proteinsequenzen war es nicht möglich, degenerierte Primer zu konstruieren (Abb. 4.16).

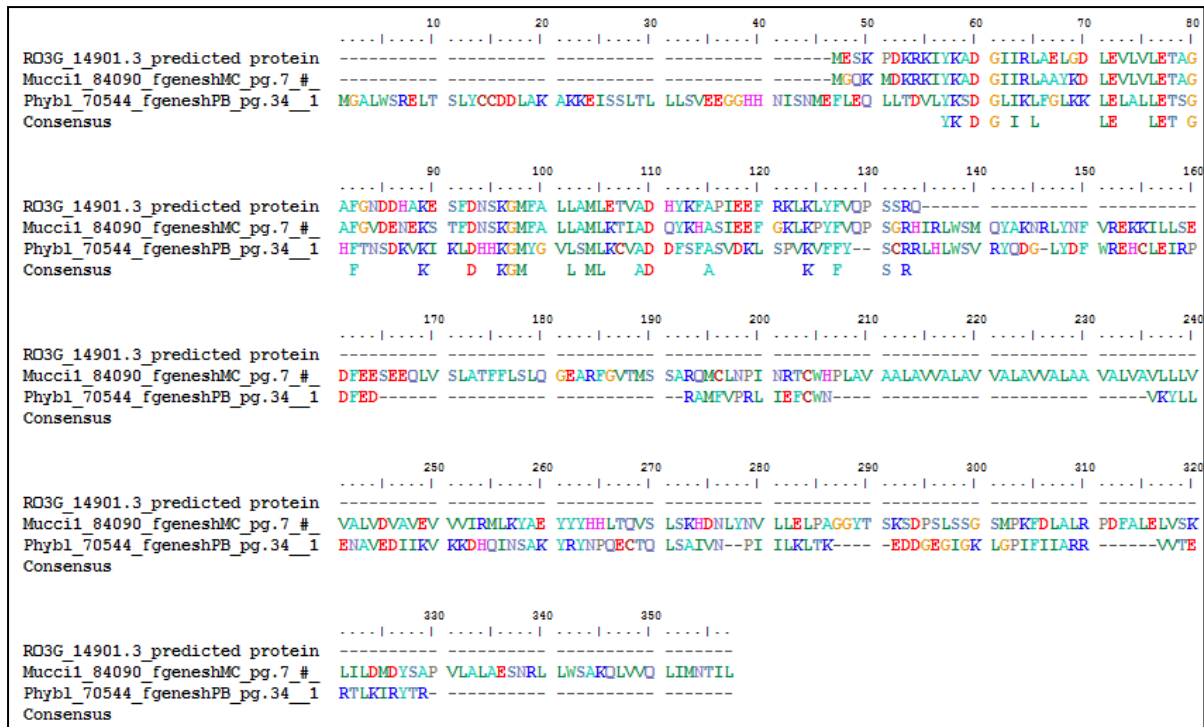


Abb. 4.16 Proteinsequenzen für 9 Zellw (predicted protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl).

4.3.10 z9: hypothetical protein

Für „z9: hypothetical protein“ fand sich beim Datenbankabgleich eine Übereinstimmung mit MAPEG superfamily/microsomal glutathione S-transferase. MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) beinhaltet Mitglieder verschiedenen Ursprungs mit unterschiedlichen biologischen Funktionen. Zur MAPEG-Familie gehört auch die mikrosomale Glutathion S-Transferase 1, die an der zellulären Verteidigung, zum Beispiel gegen oxidativen Stress beteiligt ist (Jakobsson et al., 1999).

4.3.10.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige z9- Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteomen von *Phycomyces blakesleeanus* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das Fragment zu amplifizieren.

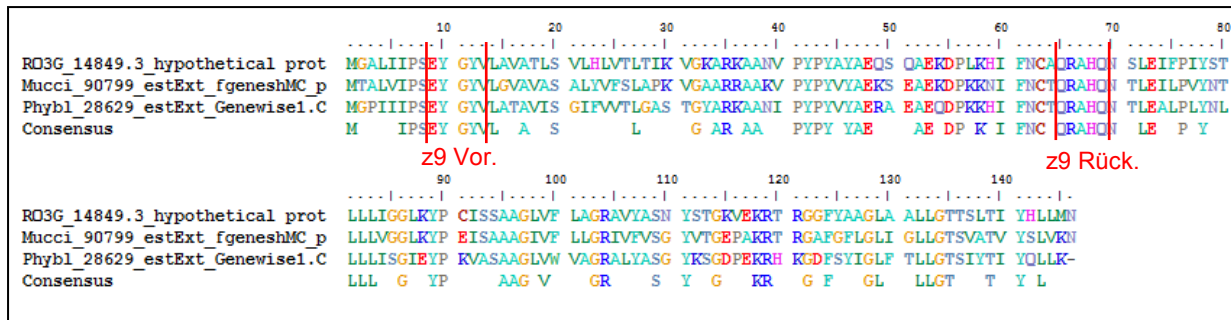


Abb. 4.17 Proteinsequenzen für z9 (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).). z9 Vor.: Vorwärtsprimer, z9 Rück: Rückwärtsprimer

Hier wurden in den markierten Regionen degenerierte Vorwärts- und Rückwärts-Primer konstruiert (Abb. 4.17), um das z9- Fragment zu amplifizieren. Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.10.2 Amplifikation des DNA- Fragments z9

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende *Mucor circinelloides*- Fragment hat eine kalkulierte Größe von 316 bp, das von *Phycomyces blakesleeenanus* 291 bp, bei *Rhizopus oryzae* sind es 294 bp. Die auf Abbildung 4.18 zu erkennende Bande liegt jedoch nur leicht oberhalb von 250 bp, was jedoch möglich ist, da die genaue Sequenz dieses Abschnitts bei *Mucor mucedo* unbekannt ist. Diese Banden wurden dennoch aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

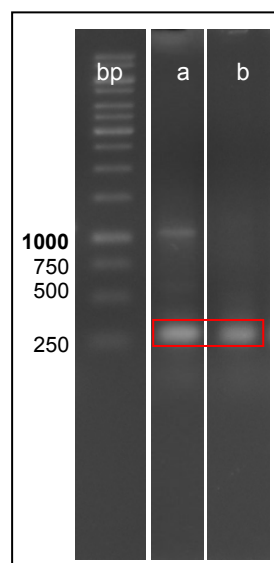


Abb. 4.18 a: Markierung: z9- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (-), b: Markierung: z9- PCR-Fragment von *Mucor mucedo* (+)

Das aus dem Agarosegel gereinigte PCR- Fragment wurde in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 21 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurde das präparierte Plasmid, in dem sich nun das z9- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das z9- Insert befand. In Abb. 4.19 ist ersichtlich, dass nur eine der Kolonien ein Plasmid mit einem z9- Insert der richtigen Größe von ca. 300 bp enthalten. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten kein Fragment. Für das aus dem Gel isolierten (+)- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R nicht erfolgreich. Nur bei dem isolierten (-)- Fragment fanden sich im anschließenden Plasmidverdau ein positiver Klon: z9(-)7. In einem nächsten Schritt ist das Plasmid mit dem z9- Insert sequenziert worden.

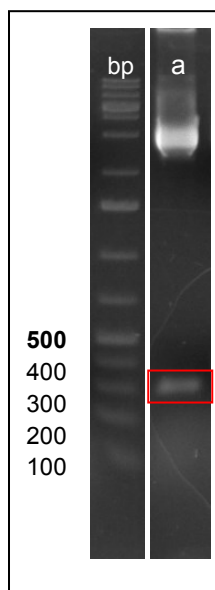


Abb. 4.19 a: Markierung: Klon z9(-)7

4.3.10.3 Sequenz des z9(-)7 – Fragments

CTGCAGTTTTGATGGGCGCTTTGAGTACAGTTGAAAACGTTCTTCTTGGGATCCT
 TTTCAGCTTCTTCCTTTTCAGCATACTAATAAAATTTACCCAAATAAGTCTAAA
 AAATATACCTCAAAAAACCCTTTTGCATTAAAGACTTACTATAAGGATAGGGGAC
 CTTGGCAGCTCTACGAGCACCGACCTTCATAGCTAACTAAGAGTGTAAAG
 AGCACTGGCGACAGCGACAGCGAGAACCTAAAAAAAATTAACCGTGGCTCCCT
 TAGAAATTGGATGAAAATACTTACATACCCGTATTCGAATTC

Rot ist hierbei die Sequenz des z9- Rückwärtsprimers markiert, grün die des z9- Vorwärtsprimers. Der Sequenzabschnitt dazwischen hat eine Länge von 316 Basenpaaren, was der Bandengröße auf dem Gel (Abb. 4.19) entspricht. Bei einem Datenbankabgleich (DOE Joint Genome Institute) dieser DNA – Sequenz wurde die Identität als MAPEG – superfamily bestätigt.

4.3.11 10 Zellw: transposon protein, putative

Der Datenbankabgleich mit NCBI lieferte in diesem Fall nur eine Übereinstimmung der Proteinsequenz mit „hypothetical protein“. Transposone wurden bereits unter 4.3.5 beschrieben.

4.3.11.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeianus* wurde mit den Proteinsequenzen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

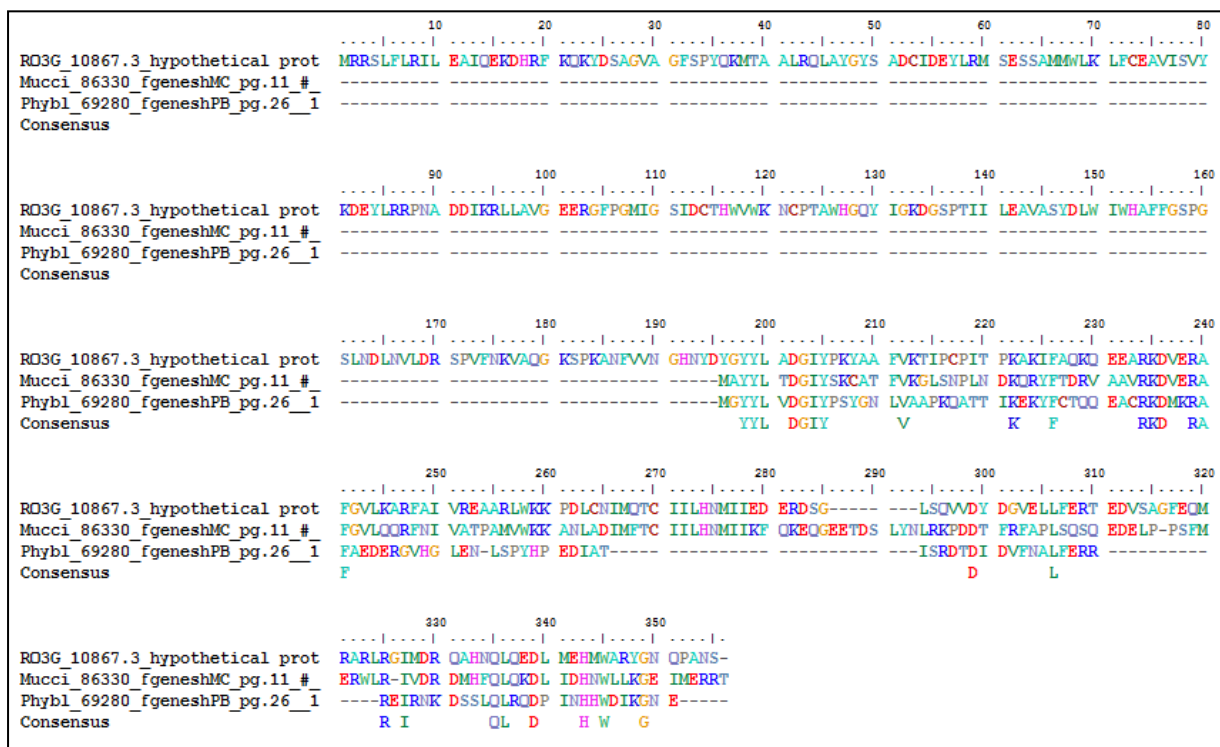


Abb. 4.20 Proteinsequenzen für 10 Zellw (transposon protein, putative) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeianus* (Phybl).

Die Konsensussequenz war für die Konstruktion degenerierter Primer nicht lang genug (Abb. 4.20), so dass diese Sequenz nicht weiter verfolgt wurde.

4.3.12 z10: hypothetical protein/riboflavin aldehyd-forming enzyme

In *Schizophyllum commune* ist das Riboflavin Aldehyd-bildende Enzym für die Produktion von Schizoflavinen durch die Oxidation von Riboflavin verantwortlich (Sreenivasaprasad, 2005).

4.3.12.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

	10	20	30	40	50	60	70	80
RO3G_09007.3_predicted protein	-----MN	RLTFILLTV	FSFCIIQTE	ALVIKRSKL	P-----FSG	KGTYIDVGP	SCGESDDSE	MVAVIMNQ
Mucci_80145_fgenesMC_pg.3_#_9	MVSTRLYTTT	ALFLVIAIN	FVFSVSTAP	LE RRIIGASKLL	QGVKGLFSG	SGTYIEVGS	SCGERDSD	LWAVINQ
Phybl_58509_fgenesPB_pg.1_37	-----	MLGIQFRS	FFWCFGLVL	VDSIALPLL	AHRRSEFSG	SGTYIMVGP	SCGETNSDE	MVAVITGQ
RO3G_00947.3_predicted protein	-MVTFARRMN	KLNFLTLLAL	FAFCILQLE	ALVIKRDEL	R-----FSG	KGNYIMVGP	TCGDFDSD	SP MVAVIRVQL
Consensus			F	I	L	FSG	G YY VG G	CG D VAVN Q

	90	100	110	120	130	140	
RO3G_09007.3_predicted protein	NNGANPNMNP	HCNKAVKIVG	TTGNEIARI	VDTCPTQVN	SLDLSPTVE	QVCGYLGQT	CKIKWFI
Mucci_80145_fgenesMC_pg.3_#_9	DNGSNPNMNP	KCDKAVSITG	DNG-SVTARV	VDTCPACANG	ALDMSPTTEK	RVCGLAEGV	CNISWKFL
Phybl_58509_fgenesPB_pg.1_37	NNGNPNMNP	HCQKTSIKG	DEG-VKARV	VDTCPCSEG	GLDMSPALFQ	RVCGLGRGR	CDIEWHYL
RO3G_00947.3_predicted protein	NNGASPYLIT	HCNSTVKWVG	TTGKEIVARV	VDSCSMQVQ	SLDLSPTVQ	QVCGSLGQS	CDIKWFI
Consensus	NG P	C	G G	AR	VD C C	LD SP F	VCG L G C I W

Abb. 4.21 Proteinsequenzen für z10 (hypothetical protein/riboflavin aldehyd-forming enzyme) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl).

Auch in diesem Fall war die Länge der übereinstimmenden Aminosäuren nicht ausreichend, um degenerierte Primer zu konstruieren (Abb. 4.21). Daher wurde diese Sequenz nicht weiter verfolgt.

4.3.13 „11 Zellw“: hypothetical protein

4.3.13.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

Die Primer wurden durch die markierten Regionen gelegt (Abb. 4.22), um das „11 Zellw“- Fragment zu amplifizieren. Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

RO3G_11787.3_hypothetical_prot	10	20	30	40	50	60	70	80
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	-----	-----	MGATDSKLAF	RKGVFRLFE	RVVFKSADDY	WTLFWTLPE	VDDVYTLVGS	TDIRKARDTA
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	MMADFSKESG	SDLVLGFNSV	MGATDSKLAF	RKGVFRLFE	RSIFVDADDY	WTLFWTLPE	TDDVFSVLVSQ	SDIRKARDTA
Consensus	-----	-----	MGATDSKLAF	RKGVFRLFE	RVVFKSADDY	WTLFWTLPE	VDDVYTLVGS	TDIRKARDTA
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	90	100	110	120	130	140	150	160
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	MENLETLIDK	LIEQMTLLN	A---NTSTQ	TIQLNCCR	LTRIIPFIFE	SPECAEWEDK	FFWTPRPLDK	NAIMPSPSTS
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	KENLETLIDK	IICQDEIHH	APVFPSTQHS	TLRLNCCR	LTRIMPVVE	SPECGEWETS	FFWTPRVSQR	--LVNPTSDD
Consensus	MENLETLIDK	LIEQMTLLN	A---NTSTQ	TIQLNCCR	LTRIIPFIFE	SPECAEWEDK	FFWTPRPLDK	NAIMPSPSTS
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	170	180	190	200	210	220	230	240
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	DOKQAAPSAA	ASTNEMLP	GEVLNLTQ	SLFLAGTLP	QSMGTAE	SKVNYVIMET	GVGSSTPIG	SSRDNDMNRTE
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	DOKQED----	KVRQDIEPP	GEVMITLAI	CLFLAGFSL	PSMATLESH	VNYVIMET	GVGSSTPIG	SSFRDNDTNRE
Consensus	DOKQAAPSAA	ASTNEMLP	GEVLNLTQ	SLFLAGTLP	QSMGTAE	SKVNYVIMET	GVGSSTPIG	SSRDNDMNRTE
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	250	260	270	280	290	300	310	320
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	-----M	YTAPAQLL	SENFWRFI	ATKLEKKV	LVLCSLINT	VCNVYDPT	GM--P	YTVVLSG
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	LLTVLLSK	SMYRSPSH	ILIKDQPLQ	YVMSRTER	KVWLFAL	LCMSINT	SCKFNP	MGWTA
Consensus	-----M	YTAPAQLL	SENFWRFI	ATKLEKKV	LVLCSLINT	VCNVYDPT	GM--P	YTVVLSG
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	320	340	350	360	370	380	390	400
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	IRQVDSGSSP	TSAEFPV	SNIEVITLES	PDVAVVFKT	SVEL	E-----	VFS	PQDQAS
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	LLVLDYHDA	QQQPHTE	TME	NAPRYL	SKLHRAQD	QFLIDGI	YRILSTP	MOTLSS
Consensus	IRQVDSGSSP	TSAEFPV	SNIEVITLES	PDVAVVFKT	SVEL	E-----	VFS	PQDQAS
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	410	420	430	440	450	460	470	480
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	LTKGLYRIL	VNPMTAR	FDYLVEND	QVLDL	TVALVF	HATE	NKNNLA	QVGL
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	MNN-----	RFKNY	LMETER	ALDL	MMVLL	FYASE	NKLD	PSQVGL
Consensus	LTKGLYRIL	VNPMTAR	FDYLVEND	QVLDL	TVALVF	HATE	NKNNLA	QVGL
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	490	500	510	520	530	540	550	560
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	LPSIIRLY	AFNGTY	ADFLII	SIFSLIA	STRGLSS	LVPAL	VLITIN	ISPY
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	LPVSIIRI	PYFNGTY	ADFLII	SIFSLIA	STRGLS	LVPAL	VLITIN	ISPY
Consensus	LPSIIRLY	AFNGTY	ADFLII	SIFSLIA	STRGLS	LVPAL	VLITIN	ISPY
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	570	580	590	600	610	620	630	640
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	NHLLAGY	LLEAFNNII	HQYSENPN	FVYSMLHHD	YFEKL	DKLTFG	TAVA	EAERL
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	NHRLVGY	LLKAFNNII	QYRFSDNPS	FIYARVNH	KKFERL	RDMTME	NALE	DIENS
Consensus	NHLLAGY	LLEAFNNII	HQYSENPN	FVYSMLHHD	YFEKL	DKLTFG	TAVA	EAERL
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	650	660	670	680	690	700	710	720
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	PSGKETG	KQERGS	-----	SEE	EAN	KQEEED	SDL	RKEEQ
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	PSKEVSG	SPFTSGG	GLSEK	-----	AKG	KLPBGS	LSRT	SSASS
Consensus	PSGKETG	KQERGS	-----	SEE	EAN	KQEEED	SDL	RKEEQ
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	730	740	750	760	770	780	790	800
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	EWFTWKS	SKLPLVS	ILKLE	SLVPSI	EERK	K-DSN	ITLEE	IKTYL
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	DWVYHWS	RLPLD	TATLIQ	DLPLK	ENM	S---A	TRNQ	IMDTL
Consensus	EWFTWKS	SKLPLVS	ILKLE	SLVPSI	EERK	K-DSN	ITLEE	IKTYL
RO3G_11787.3_hypothetical_prot	810	820	830	840	850			
Mucci_33345_e_gw1.1.1458.1	GHNIVST	MTKD	YGPWNG	THVK	LFOIKQ	G---		
Phybl_75966_estExt_fgenesHPB_p	GQIVYSS	IAN	YGPWNG	TSVK	LFOIKQ	QETP	QNE	-----
Consensus	GHNIVST	MTKD	YGPWNG	THVK	LFOIKQ	G---		

Abb. 4.22 Proteinsequenzen für 11 Zellw (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeana* (Phybl).). 11 Zellw Vor.: Vorwärtsprimer, 11 Zellw Rück: Rückwärtsprimer

Zunächst wurde eine PCR bei einer Annealingtemperatur von 55 °C durchgeführt, bei der jedoch kein PCR- Produkt entstand. Auch bei 50 und 45 °C waren keine Banden ersichtlich, so dass diese Sequenz nicht weiter verfolgt werden konnte. Aufgrund der geringen Übereinstimmung zwischen den Aminosäuresequenzen von *P. blakesleeenanus*, *R. oryzae* und *M. circinelloides* für das Protein „hypothetical protein“ war es nicht möglich, weitere degenerierte Primer zu konstruieren, die möglicherweise zu einem PCR-Fragment geführt hätten.

4.3.14 d3: signalosome complex subunit/JUN kinase

JUN Kinasen werden durch MAP Kinasen reguliert. Sie werden aktiviert, wenn die Zelle Zytokinen oder Stress ausgesetzt ist. Genetische und biochemische Studien zeigen, dass dieser Signaltransduktionsweg auch die Zellproliferation, Apoptose und Gewebemorphogenese reguliert (Ip et al., 1998).

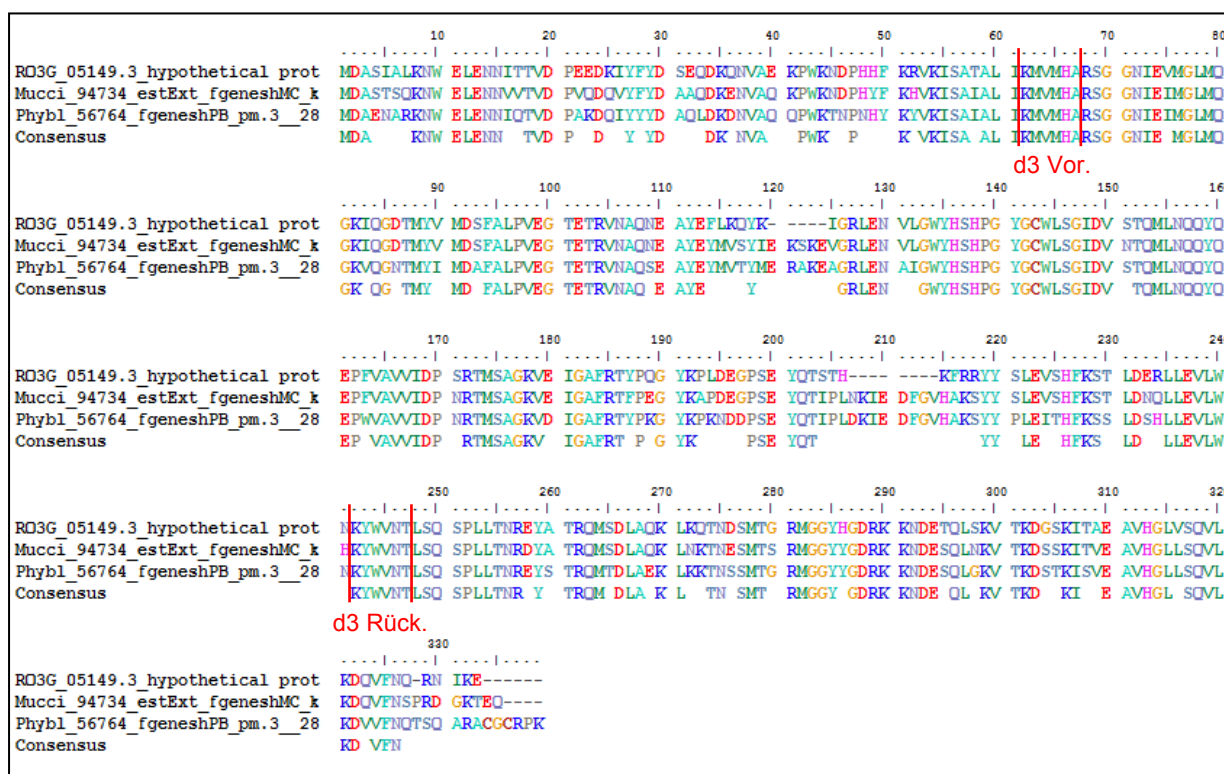


Abb. 4.23 Proteinsequenzen für d3 (signalosome complex subunit/JUN Kinase) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl).). d3 Vor.: Vorwärtsprimer, d3 Rück: Rückwärtsprimer

4.3.14.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren. In den markierten Regionen wurden degenerierte Vorwärts- und Rückwärts- Primer konstruiert, um das entsprechende DNA- Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.23). Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.14.2 Amplifikation des DNA- Fragments d3

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 853 bp, was hier nicht der Größe der resultierenden Bande entspricht (Abb. 4.24). Die erhaltene Bande von einer ungefähren Größe von 600 bp wurde dennoch aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

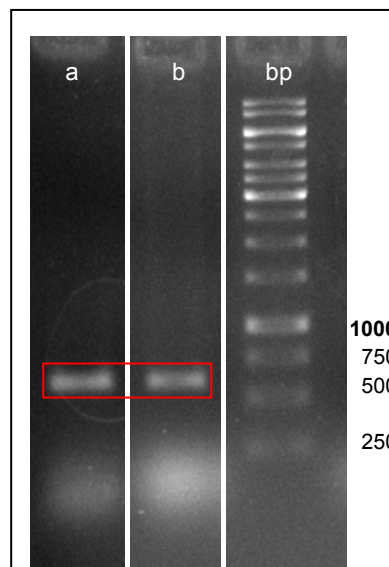


Abb 4.24 a: Markierung: PCR- Produkt d3 Mm (-); b: Markierung: PCR-Produkt d3 Mm (+)

Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation

durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das d3- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das d3- Insert befand. In Abb. 4.25 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem d3- Insert der Größe von ca. 600 bp enthalten. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten kein Fragment. Für das aus dem Gel isolierten (-)- PCR-Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R nicht erfolgreich. Nur bei dem isolierten (+)- PCR- Fragment fanden sich im anschließenden Plasmidverdau zwei positive Klone: d3(+)₁ und d3(+)₃. In einem nächsten Schritt sind die Plasmide mit dem d3- Insert sequenziert worden.

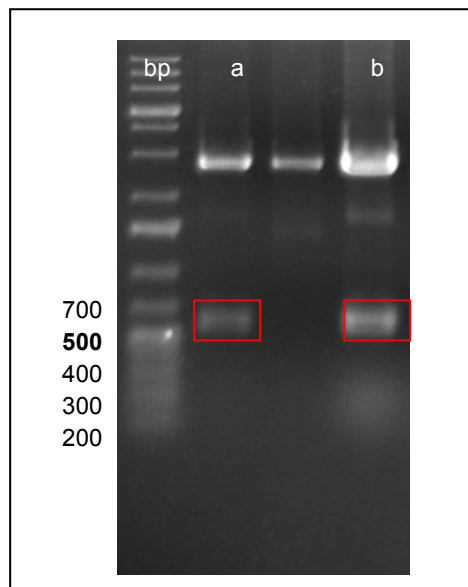


Abb 4.25 a: Markierung: Klon d3(+)₁ b: Markierung: Klon 3(+)₃

4.3.14.3 Sequenz des d3(+)₁ – Fragments

CTGCAGGTGTTGACCCAGTACTTATTCCATAAGACTTCTAAAAGCTGAGTATCCA
AAGTAGATTTGAAATGAGAGACTTCGAGAGAGTAATATGATTTGGCATGAACACC
AAAATCTTCGATTTTCGTTGAGGGGTATAGTCTGATATTCAGATGGACCTTCATCT
GGTGGTTTATAACCTGTGGGGAAAGTCCTAAAAGCACCAATTTCAACCTTTCCA
GCAGACATTGTACGATTGGGGTCAATAACAACAGCCACAAATGGTTCCTGATAC
TGTTGATTTAACATTTGCGTGTTAACATCAATACCAGATAACCAGCAACCATAAC
CAGGATGTGAATGATACCATCCTAAAACATTCTCCAGTCTACCAACCTGATAAAC

CATACATCAATTTATAATCCGCATATTACCTTCAATATTGTTTGATGTTACCTCCT
TTGACTTCTCAATGTAGGATACCATGTATTCATACGCTTCGTTTTGAGCATTACT
CTGGTCTCAGTTCCTTCAACGGGAAGAGCAAACTATCCATAACATACATTGTAT
CCCCTTGAATTTTGCCTTGCATTAAACCCATGATTTTCGATATTACCGCCAGAACG
AGCGTGCATCACCATCTTGAATTC

Rot ist hierbei die Sequenz des d3- Rückwärtsprimers markiert, grün die des d3- Vorwärtsprimers. Der Sequenzabschnitt dazwischen hat eine Länge von 583 Basenpaaren, was der Bandengröße auf dem Gel (Abb. 4.24, 4.25) entspricht. Die Sequenz des d3(+)-3 Fragments ist identisch. Ein Datenbankabgleich dieser Sequenz bestätigte die Identität des Gens als putative JUN Kinase.

4.3.15 d5: hypothetical protein

Durch einen Abgleich mit der NCBI-Datenbank wurde für dieses „hypothetical protein“ ein „protein transport protein/hypothetical protein“ gefunden, das nicht weiter spezifiziert wurde.

4.3.15.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Für *Rhizopus oryzae* wurde keine passende Sequenz in der Datenbank gefunden, daher wurden nur *P. blakesleeanus* und *M. circinelloides* miteinander verglichen. Diese beiden Sequenzen wurden aligniert und nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren. Das Fragment hat bei *Mucor circinelloides* eine Länge von 305 Basenpaaren.

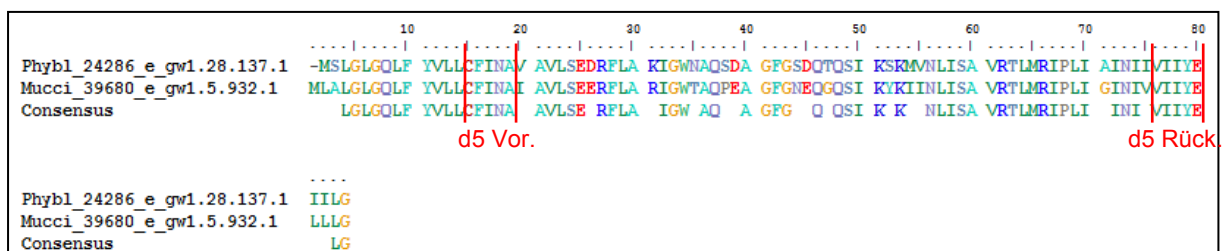


Abb. 4.26 Proteinsequenzen für d5 (hypothetical protein) von *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl) und *Mucor circinelloides*.). d5 Vor.: Vorwärtsprimer, d5 Rück: Rückwärtsprimer

Für die markierten Regionen (Abb. 4.26) wurden degenerierte Vorwärts- und Rückwärtsprimer konstruiert, deren Sequenz ist unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.15.2 Amplifikation des DNA- Fragments d5

Da bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und 50°C keinerlei Banden ersichtlich wurden, wurde die PCR bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 305 bp. Auf Abbildung 4.27 sind nun mehrere PCR-Produkte erkennbar. Dennoch wurde die Bande in Höhe von 300 bp ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

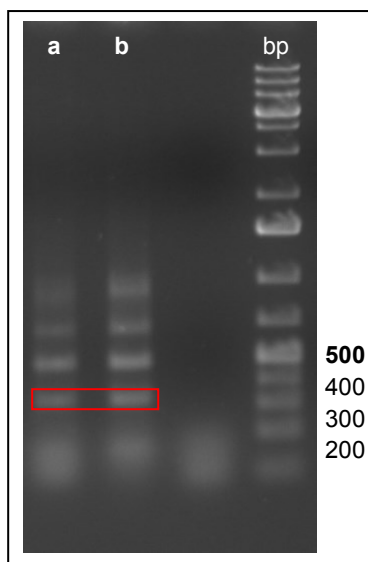


Abb. 4.27 a: Markierung: PCR-Produkt d5 Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt d5 Mm(+)

Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das d5- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das d5- Insert befand.

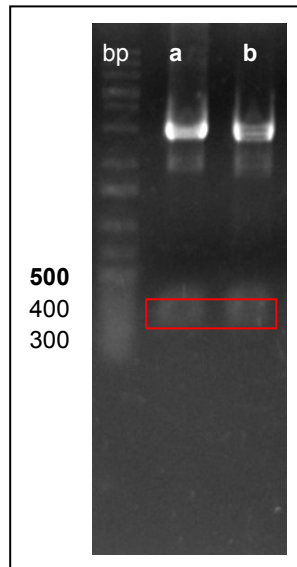


Abb. 4.28 a: Markierung: Klon d5(-)1, b: Markierung: Klon d5(+)1

In Abb. 4.28 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem d5- Insert der Größe von ca. 300 bp enthalten. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten ebenfalls ein Fragment. Sowohl für das aus dem Gel isolierten (-)- PCR-Fragment als auch das (+)- PCR- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt sollten die Klone d5(-)1 und d5(+)1 sequenziert werden.

4.3.16 d6: predicted protein

Für das „predicted potein“ wurde in der NCBI-Datenbank eine Übereinstimmung mit „RNase H2 Ydr279 superfamily“ gefunden. RNasen H2 sind Enzyme, die spezifisch RNA hydrolysieren und sind vermutlich bei der Entfernung von Okazaki Fragmenten beteiligt (Arudchandran et al., 2000; Qiu et al., 1999), ebenso wie bei der Entfernung von Einzelribonukleotiden in DNA-DNA Duplexen (Eder et al., 1993).

4.3.16.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeenanus* verglichen. Hier wurden nur die Sequenzen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* aligniert, da keine übereinstimmende Sequenz von *P. blakesleeenanus* gefunden wurde. Es wurde nach konservierten Regionen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

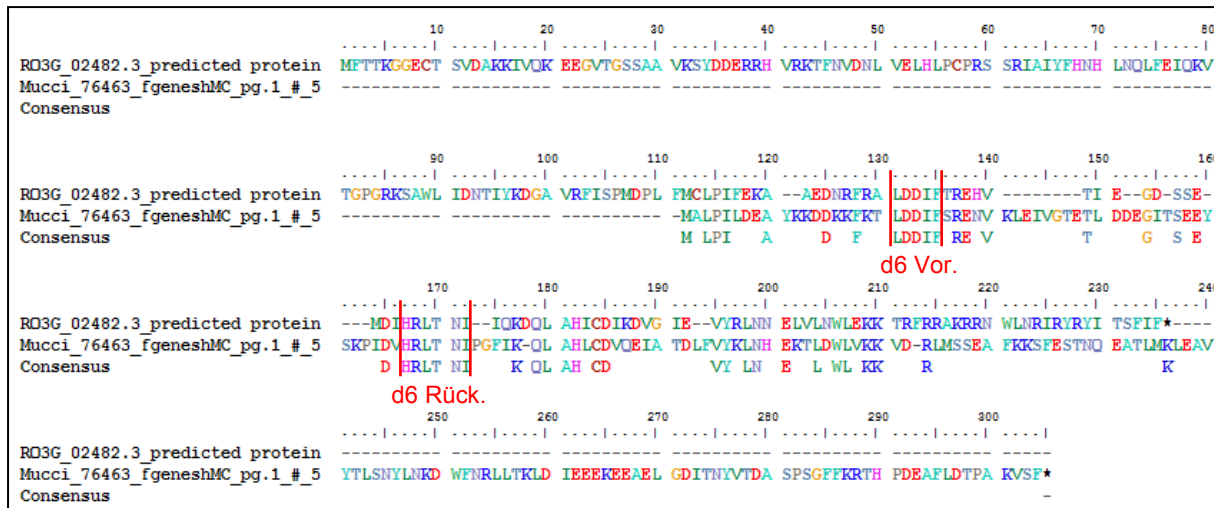


Abb. 4.29 Proteinsequenzen für d6 (predicted protein) von *Rhizopus oryzae* (RO) und *Mucor circinelloides* (Mucci).). d6 Vor.: Vorwärtsprimer, d6 Rück.: Rückwärtsprimer

Hier wurden in den markierten Regionen degenerierte Vorwärts- und Rückwärts-Primer konstruiert, um das Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.29). Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.16.2 Amplifikation des DNA- Fragments d6

Das erwartete PCR-Fragment besitzt eine Gesamtlänge von 108 Basenpaaren bei *Mucor circinelloides*. Die PCR wurde bei verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt: 55 °C, 50 °C und 45 °C. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Jedoch war die Amplifikation bei keiner dieser Temperaturen erfolgreich, so dass diese Sequenz nicht weiter verfolgt wurde.

4.3.17 d7: hypothetical protein

Für die Proteinsequenz des „hypothetical protein“ wurde bei einem NCBI-Datenbankabgleich eine Übereinstimmung mit „Ras-like-GTPase superfamily“ gefunden. Ras-like GTPasen sind an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie Zellteilung, Differenzierung, Zell-Zell-Adhäsion, Wachstum und Apoptose. Sie sind „molekulare Schalter“ für viele Signaltransduktionswege. Oncogene wie H-, N- und K-Ras gehören zu dieser Familie (van Dam et al., 2011).

4.3.17.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* wurde mit den Proteomen von *Phycomyces blakesleeenanus* und *Mucor circinelloides* verglichen. Diese drei

Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

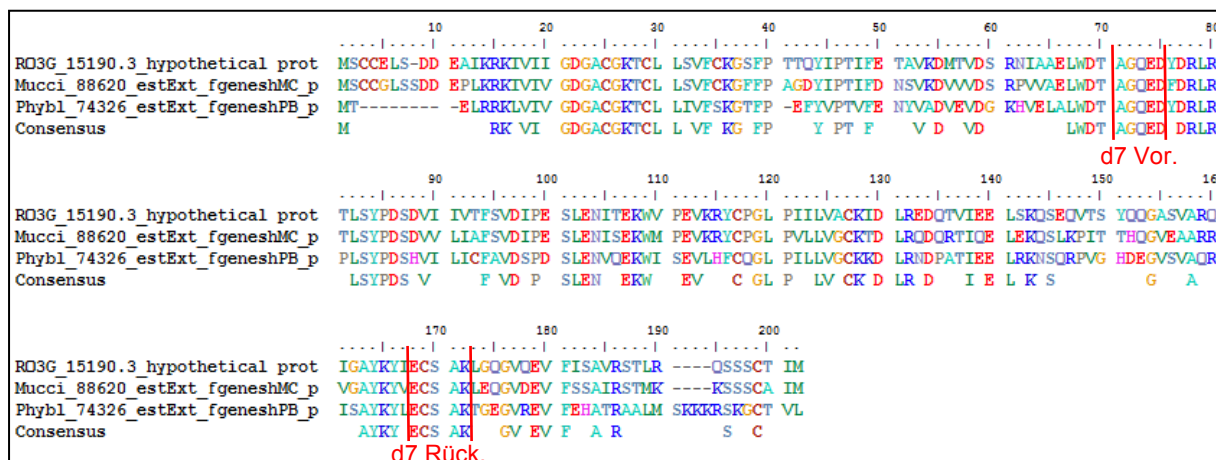


Abb. 4.30 Proteinsequenzen für d7 (hypothetical protein) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl).). d7 Vor.: Vorwärtsprimer, d7 Rück: Rückwärtsprimer

Hier wurden in den markierten Regionen degenerierte Vorwärts- und Rückwärts- Primer konstruiert, um das Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.30). Die Primersequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

4.3.17.2 Amplifikation des DNA- Fragments d7

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 421 bp, was hier ungefähr der Größe der resultierenden Bande entspricht (Abb. 4.31). Die erhaltene Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das d7- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das d7- Insert befand.

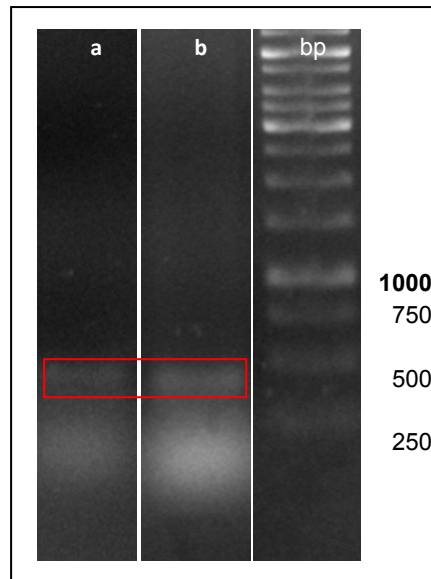


Abb. 4.31 a: Markierung: PCR-Produkt d7 von Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt d7 von Mm(+)

In Abb. 4.32 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem d7- Insert der Größe von 421 bp enthalten. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten kein Fragment. Für das aus dem Gel isolierten (+)- PCR-Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R nicht erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurden die Klone d7(-)3 und d7(-)4 sequenziert. Für d7(-)3 fand sich nach der Sequenzierung keine übereinstimmende Sequenz in der Datenbank, daher wird sie hier nicht aufgeführt.

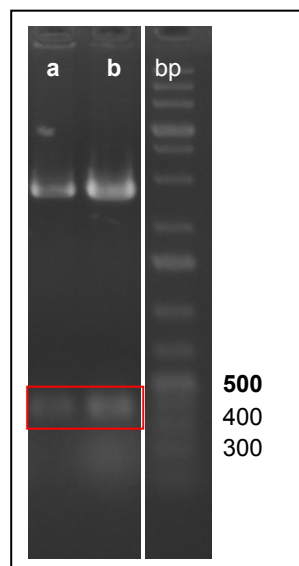


Abb. 4.32 a: Markierung: Klon d7(-)3; b: Markierung: Klon d7(-)4

4.3.17.3 Sequenz des d7(-)4 – Fragments

CTGCAGCTTCGCGGTGCATTACCATACTTTGCTCCAATCTCTTTTGCTAACTTG
ATGCCCTATATACAGAATAAGTTCACTTTGATAGGCGTGTGACTATGGTTGTG
TACCTGTTGTTGACTGATGGTTTTGTTGGATTCCGAACGTAAATCGATTTTGAGA
CCAGCTAGTACTAACGACACATTATTTCCACAATAGTGTTTGACCTCGGGCAGC
CACTATAAGTAAAGCATAAGTCCATATGTCCCCCAAAGTGTAAAGTCTAATTTTAA
CCTTGTCCTGACATTTTGAAAGGAGTTTTGATTATTGACAACAAAGAATAACAT
AACATCCCACCTACCCATTATTGTATACACCCGAATC

Rot ist hierbei die Sequenz des d7- Rückwärtsprimers markiert, der Vorwärtsprimer konnte in diesem Abschnitt nicht gefunden werden, da er bei der Sequenzierung vermutlich außerhalb der Reichweite der Polymerase lag. Anhand eines Datenbankabgleichs konnte jedoch bestätigt werden, dass diese Sequenz der gesuchten Ras-like-GTPase superfamily angehört (vergl. Tab. 4.1).

4.3.18 d9 predicted protein

Für diese Proteinsequenz von *Rhizopus oryzae* konnte weder in der Proteindatenbank von *Mucor circinelloides* noch von *Phycomyces blakesleeana* eine übereinstimmende Sequenz gefunden werden. Auch eine abgleichende Suche in der NCBI-Datenbank blieb erfolglos. Da die bei der MASCOT-Analyse gefundene Proteinsequenz außerdem sehr kurz ist, wurden hier keine Primer zur weiteren Analyse konstruiert.

4.3.18.1 Proteinsequenz von d9

MGPGEDDRNRLEYGPEGYLTLSSGGRAETEMKVEVKGPKEGPYPNA*

4.3.19 d10: stomatin

Stomatin ist ein Membranprotein, das erstmals aus humanen roten Blutkörperchen isoliert wurde (Hiebl-Dirschmied et al., 1991). Seither sind Stomatin-ähnliche Proteine in allen drei Domänen identifiziert worden, wobei ihre Funktion noch unklar ist (Green et al., 2004). Ein Verlust von Stomatin beim Menschen wird mit einem Zustand in Verbindung gebracht, der „overhydrated hereditary stomatocytosis“ genannt wird, bei dem rote Blutkörperchen Na⁺ und K⁺ -Ionen verlieren (Delaunay et al., 1999).

Ein Stomatin-ähnliches Protein ist bei dem Konkurrenzkampf von *Rhizobium etli* um die Nodulation der Wurzeln von *Phaseolus vulgaris* (You et al., 1998) beteiligt.

4.3.19.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Phycomyces blakesleeanus* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Mucor circinelloides* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

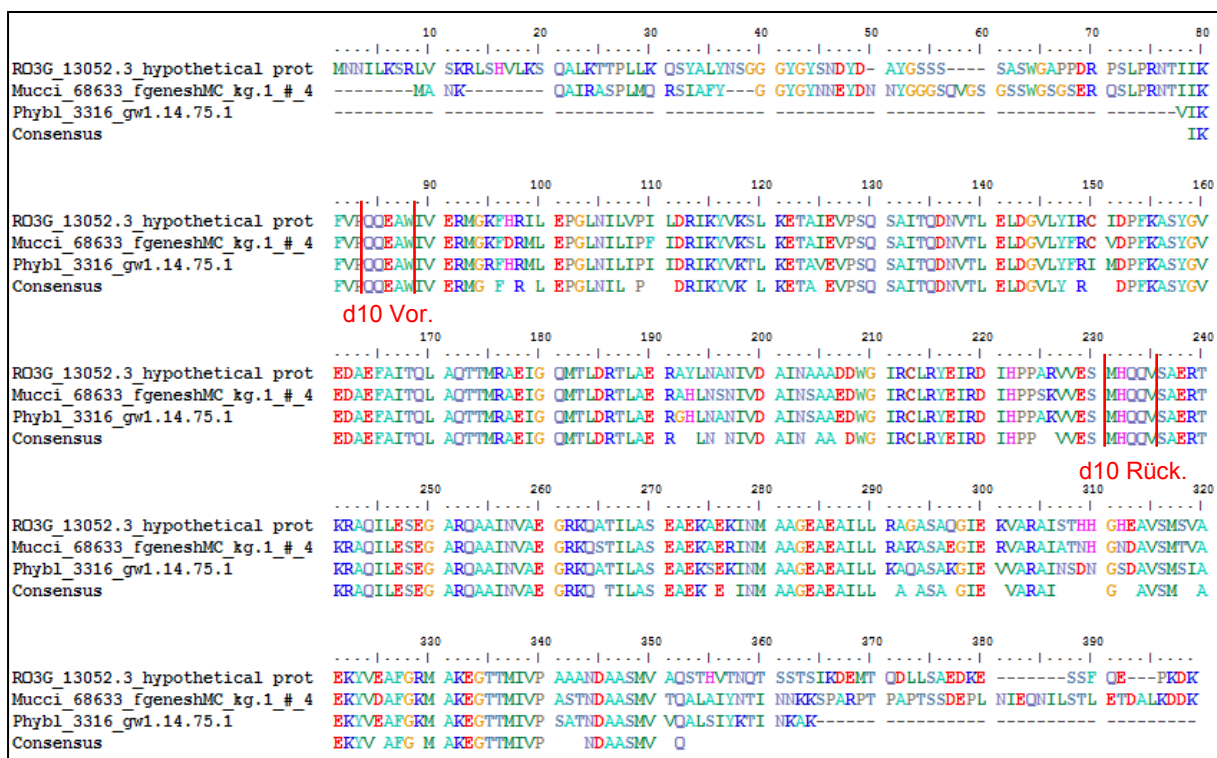


Abb. 4.33 Proteinsequenzen für d10 (stomatin) von *Rhizopus oryzae* (RO), *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl). d10 Vor.: Vorwärtsprimer, d10 Rück: Rückwärtsprimer

Durch die rot markierten Bereiche wurden die Vorwärts- und Rückwärtsprimer gelegt (Abb. 4.33), deren Sequenzen unter 2.5.1 aufgeführt sind.

4.3.19.2 Amplifikation des DNA- Fragments d10

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 602 bp, was hier der Größe der resultierenden Bande

entspricht (Abb. 4.34). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

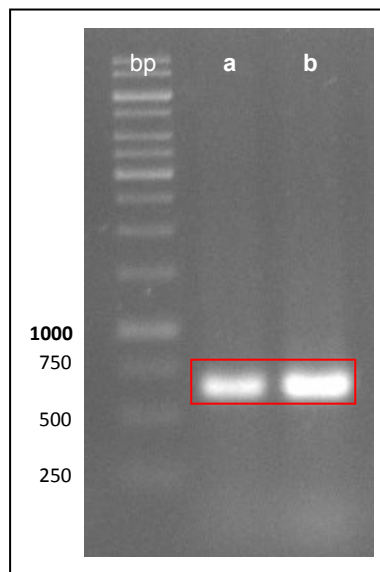


Abb 4.34 a: Markierung: PCR-Produkt von d10 Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt von d10 Mm(+)

Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das d10- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das

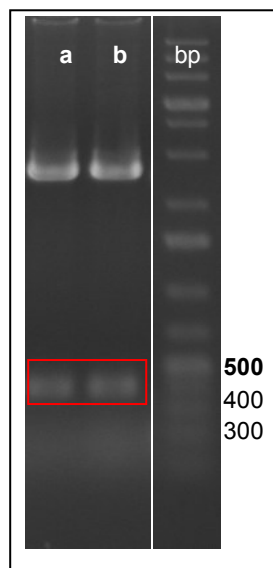


Abb. 4.35 a: Markierung: Klon d10(+)-1; b: Markierung: Klon d10(-)-4

Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das d10- Insert befand. In Abb. 4.35 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem d10- Insert enthalten. Einige der übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten ebenfalls ein Fragment dieser Größe. Sowohl für das aus dem Gel isolierten (+)- PCR-Fragment als auch für das (-) PCR- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurden die Klone d10(+)-1 und d10(-)-4 sequenziert. Für beide Sequenzen fand sich im anschließenden Datenbankabgleich eine Übereinstimmung mit dem gesuchten Stomatin-Fragment.

4.2.19.3 Sequenz des d10(+)-1 Fragments

```
GTGGATACGCAGTGATTCATTTTATGAACCACGTTATAGATAACGTTACACTTGA
GTTGGATGGTGTGTTTATACTTTAGATGTATCGACCCTTTCAAGGTACGCATTAAA
TAGAATGACTTTTTTTTATTACGTCATACTAAGGATATGTAGGCATCGTATGGTGT
GAAGATGCCGAATTTGCAATCACTCAACTAGCACAAACAACCATGCGTGCGAGAA
ATTGGACAAATGACTTTAGATCGTACTTTGGCTGAACGTGCACACTTAAATTCAA
ACATTGTTGATGCAATTAACCTCTGCTGCTGAGGATTGGGGTATTCGTTGCTTGC
GTTATGAAATTCGTAAGTAACACTTAGGATGTAAGGGCGCAAAGTATTAATTTTT
TTTTATTTAAGGTGATATTCACCCTCCTGTCAAGGTTGTTGAATCTATGCACCAA
CAAGTCTGCAG
```

Rot ist hierbei die Sequenz des d3- Rückwärtsprimers markiert, die Sequenz des Vorwärtsprimers konnte nicht gefunden werden. Die Sequenz für Klon d10(-)-4 ist identisch mit der oben angegebenen. Beide Sequenzen wurden mit der Datenbank des Joint Genome Institutes und der NCBI abgeglichen und die Identität dieses Fragments als „Stomatin-like“ bestätigt.

4.3.20 A2: Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenase katalysiert die NAD/NADH abhängige Konversion der Substrate Malat und Oxalacetat. Diese Reaktion ist wichtiger Bestandteil des Zitronensäurezyklus in der mitochondrialen Matrix (Minárik et al., 2002).

4.3.20.1 Konstruktion der Primer

Die Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeenanus* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren (Abb. 4.36).

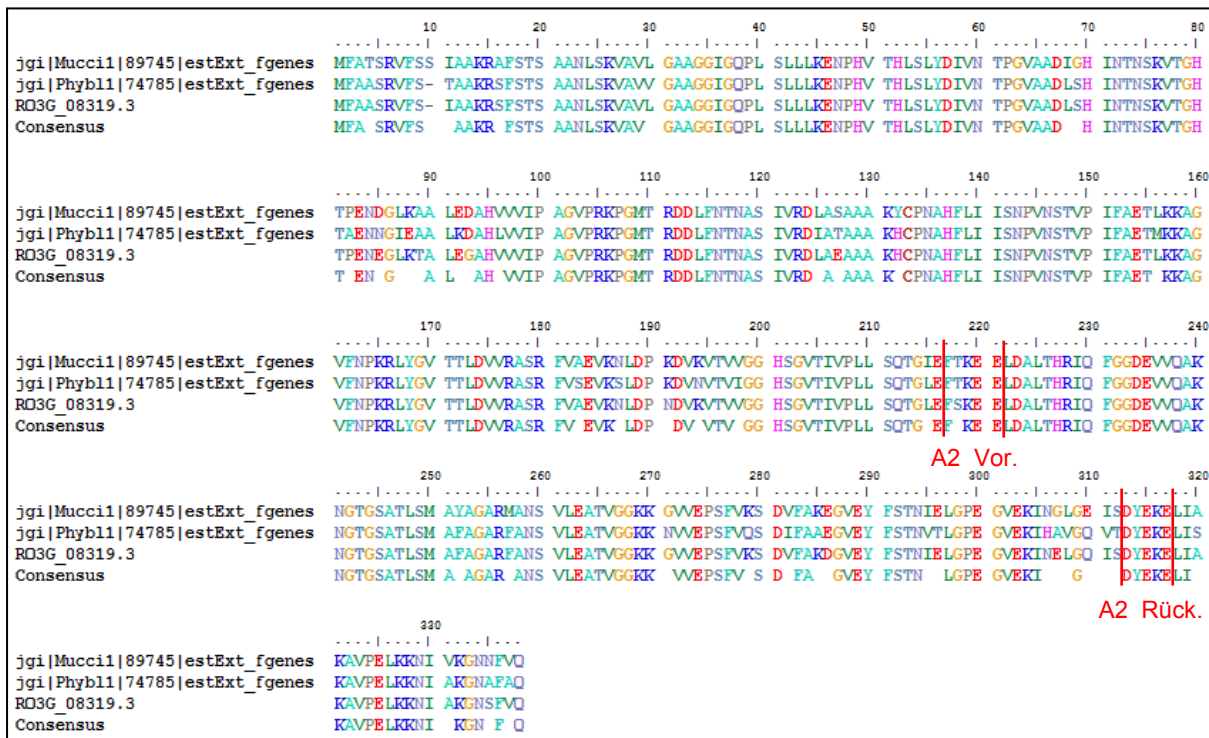


Abb. 4.36 Proteinsequenzen für A2 (malate dehydrogenase) von *Mucor circinelloides* (Mucci), *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl) und *Rhizopus oryzae* (RO).). A2 Vor.: Vorwärtsprimer, A2 Rück.: Rückwärtsprimer

Durch die rot markierten Sequenzen wurden degenerierte Primer gelegt, deren Sequenzen unter 2.5.1 aufgeführt sind.

4.3.20.2 Amplifikation des DNA- Fragments A2

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 302 bp, was hier ungefähr der Größe der resultierenden Bande entspricht (Abb. 4.37). Das amplifizierte PCR- Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert. Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R

kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das A2- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das A2- Insert befand.

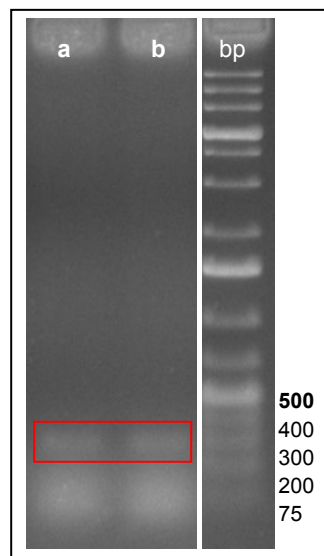


Abb 4.37 a: Markierung: PCR-Produkt von A2 Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt von A2 Mm(+)

In Abb. 4.38 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem A2- Insert enthalten. Einige der übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten ebenfalls ein Fragment dieser Größe. Sowohl für das aus dem Gel isolierten (+)- PCR-Fragment als auch für das (-) PCR- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurden die Klone A2(-)1 und A2(+)1 sequenziert.

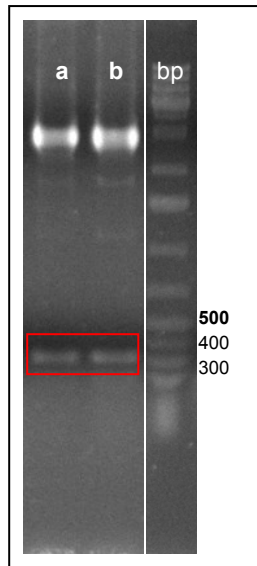


Abb. 4.38 a: Markierung: Klon A2(-)1; b: Markierung: Klon A2(+)1

4.3.20.3 Sequenz des A2(-)1 Fragments

CTGCAGTCTTTCTCGTAATCAGAGATCTCATCGAGACCGTGGATCTTCTCGACA
 CCTTCGGGACCAAGTTCAATGTTGGTAGAGAAGAACTCAACACCTTCCTTGGCA
 AAGATATCAGATTGGACGAAAGAGGGCTCAACGACACCCTTCTTACCACCAACA
 GTGGCTTCCAAAACAGAGTTGGCCATACGGGCACCAGCATAAGCCATGGAGAG
 AGTGGCAGAACCAGTACCGTTCTTGGCTTGAACAACTTCATCACCACCGAATTG
 GATACGGTGAGTTAAAGCATCGAGCTCTTCCTTCGAAAGAATTC

Rot ist hierbei die Sequenz des A2- Rückwärtsprimers markiert, die Sequenz des Vorwärtsprimers konnte nicht gefunden werden. Die Sequenz für Klon A2(+)1 ist identisch mit der oben angegebenen. Beide Sequenzen wurden mit der Datenbank des Joint Genome Institutes und der NCBI abgeglichen und die Identität dieses Fragments als „Malatdehydrogenase“ bestätigt.

4.3.21 A3: Malatdehydrogenase

Die Funktion der Malatdehydrogenase wurde unter 4.3.21 beschrieben.

4.3.21.1 Konstruktion der Primer

Die vollständig Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeenanus* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu

amplifizieren (Abb. 4.39). Durch die rot markierten Sequenzen wurden die degenerierten Primer gelegt, deren Sequenzen unter 2.5.1 aufgeführt sind.

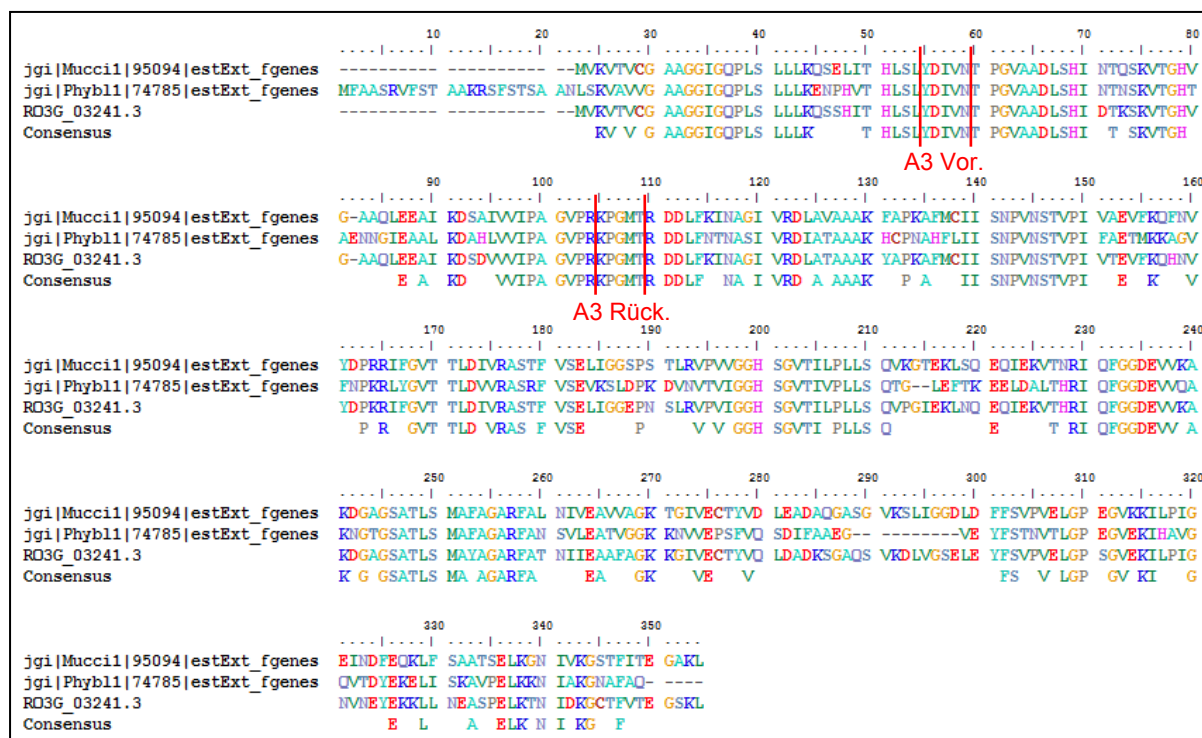


Abb. 4.39 Proteinsequenzen für A3 (malate dehydrogenase) von *Mucor circinelloides* (Mucci), *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl) und *Rhizopus oryzae* (RO). A3 Vor.: Vorwärtsprimer, A3 Rück: Rückwärtsprimer

4.3.21.2 Amplifikation des DNA- Fragments A3

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 275 bp, was hier ungefähr der Größe der oberen resultierenden Bande entspricht (Abb. 4.40). Die obere Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert. Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen

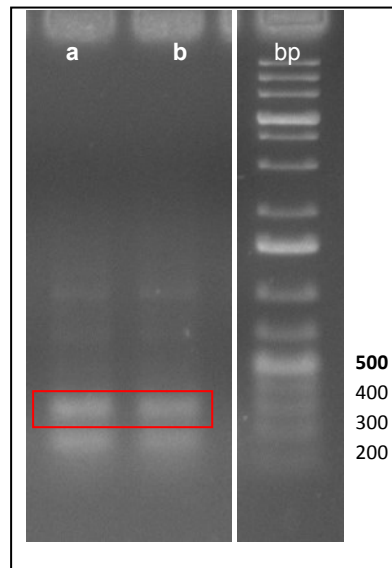


Abb. 4.40 a: Markierung: PCR-Produkt von A3 Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt von A3 Mm(+)

sich nun das A3- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das A3- Insert befand.

In Abb. 4.41 ist ersichtlich, dass zwei der Kolonien ein Plasmid mit einem A3- Insert enthalten. Einige der übrigen Klone (hier nicht gezeigt) enthielten ebenfalls ein Fragment dieser Größe. Sowohl für das aus dem Gel isolierten (+)- PCR-Fragment als auch für das (-) PCR- Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurden die Klone A3(-)3 und A3(+1) sequenziert.

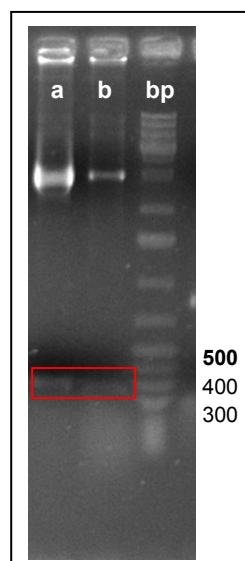


Abb. 4.41 a: Markierung: Klon A3(-)3, b: Markierung: Klon A3(+1)

4.3.21.3 Sequenz des A3(+)-1 Fragments

CTGCAGGTCATGCCGGGCTTCTGGGGACACCAGCGGGGATGACAACTACACC
 AGAGAGATGTTATCAGTGATTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTAACCAATAG
 AAGCATCTTTAATAGCTTCTTCAATTTGAGCTGCACCAACATGACCGGTTACCTT
 GGACTGAGTGTTAATATGACTTTATAAATCCAAAGAACGTTAGTTTAAATGGTAA
 CCTATGGAAAAAAAAATGGGTAGAAAAAGGGAAAATACCTAAGATCAGCGGCAAC
 ACCGGGAGTATTGACGATATCGTAGAATT

Rot ist hierbei die Sequenz des A3- Rückwärtsprimers markiert, die Sequenz des Vorwärtsprimers konnte nicht gefunden werden. Die Sequenz für Klon A3(-)-3 ist identisch mit der oben angegebenen. Beide Sequenzen wurden mit der Datenbank des Joint Genome Institutes und der NCBI abgeglichen und die Identität dieses Fragments als „Malatdehydrogenase“ bestätigt.

4.3.22 A4: Acyl-CoA Dehydrogenase

Acyl-CoA Dehydrogenasen sind eine Gruppe mitochondrialer Flavoenzyme die α , β -Dehydrogenisierung von Acyl-CoA Estern in der Fettsäure- β -Oxidation katalysieren (He et al., 2007).

4.3.22.1 Konstruktion der Primer

Die komplette Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeanus* verglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren.

Durch die in Abb. 4.42 markierten Sequenzen wurden degenerierte Primer gelegt. Deren Sequenzen sind unter 2.5.1 aufgeführt.

	10	20	30	40	50	60	70	80
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	MFARQLIRSS	AITTAFTKPG	LTSARTFSYK	AKSFVKIDWE	DPLNLNLSLT	EEBQLVRDSV	RDYCCENLQP	RVLNAYRNEK
RO3G_01095.3	MQSLSRITS-	-----	HRPF LT--	RTLATK P-TFVKYNWE	DPLNLEKLLT	EDEVSIKDA	KSYCCERLLP	RVIQAYRHEK
Consensus				K	FKY WE DPLNL LLT E E RD	YQE L P RV	AYR EK	
	90	100	110	120	130	140	150	160
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	FDREIMSEMG	ELGFLGSTID	GYGCAGVSSV	AYGLTAREVE	NVDSGYRSAM	SVQSSLMVHP	INAYGTDQK	DKYLPRLAKG
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	FDREIMSEMG	ELGFLGSTIE	GYGCAGVSSV	AYGLTAREVE	RVDSGYRSAM	SVQSSLMVHP	IYAYGTDQK	EKYLPLDAKG
RO3G_01095.3	FDREIMSEMG	ELGFLGSTIE	GYGCAGVSSV	AYGLTAREVE	RVDSGYRSAM	SVQSSLMVHP	INAYGSDECK	ERLLPLDAKG
Consensus	FDREIM	EMG ELGFLGSTI	GYGCAGVSSV	AYGLTAREVE	VDSGYRSAM	SVQSSLMVHP	I AYG D QK	LP LAKG
	170	180	190	200	210	220	230	240
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	EIVGCFGLTE	PNHGSDPSSM	ETTAKKVNGH	YVLNGSKTWI	TNSPIADV	VWAKNLDEGG	AIRGFILEKG	MAGLDAPAIK
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	VKVGCFGLTE	PNHGSDPSSM	ETTAKKVNGH	YVLNGSKTWI	TNSPIADV	VWAKNLDEGG	AIRGFILEKG	MAGLEAPAIK
RO3G_01095.3	EIVGCFGLTE	PNHGSDPSSM	ETTAKKVNGH	YVLNGSKTWI	TNSPIADV	VWAKNLDEGG	TIRGFLLEKG	MAGLETPTVIQ
Consensus	VGCFGLTE	PNHGSDP	M ETTAKKVNGH	YV NGSKTWI	TNSPIADV	VWAKNLDEGG	IRGF LE G MAGL	P I
	250	260	270	280	290	300	310	320
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	GKFSLRASIT	EMIMDNVEI	PVENMLPNAK	GLGGPFGLN	NARYGIANGA	LGAEEACLEQ	ARTYTLDRQ	FGRPLAANQL
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	GKFSLRASIT	EMIMDNVEV	PVDNMLPNVK	GLGGPFGLN	NARYGIANGA	LGSAEFLAQ	ARQYTMERQ	FARPLAANQL
RO3G_01095.3	GKFSLRASIT	EMIMDNVEV	PVENMLPNAK	GLGGPFGLN	NARYGIANGA	LGAEEACLEQ	ARTYTLDRQ	FGRPLAANQL
Consensus	GKFSLRAS T	EMIMDN	VE PV NMLP	K GL GPFGCLN	NARYGIANGA	LG AE CL Q AR YT	RQ F RPLAANQL	
	330	340	350	360	370	380	390	400
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	IQKKLADANT	EIALGLQACV	QVGRKDGGE	LAFEMISMIIK	RNSCGKALAI	ARECRDMLGG	NGISDEYHII	RHAANLEAVN
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	IQKKLADANT	EIALGLQACV	QVGRKDGAGE	LAFEMISMIIK	RNSCGKALAI	ARECRDMLGG	NGISDEYHII	RHAANLEAVN
RO3G_01095.3	IQKKLADANT	EIALGLQACV	QVGRKDENE	LAEMISMIIK	RNSCGKALAI	ARECRDMLGG	NGISDEYHVI	RHAANLEAVN
Consensus	IQKKLADANT	EIA GLQACV	QVGRKDG	E LA EMISMIIK	RNSCGKA I	ARECRDMLGG	NGISDEYH I	RHAANLEAVN
	410	420						
jgi Mucc11 49181 estExt_Genewi	TYEGTHDVHA	LILGKAITGI	PAPAN					
jgi Phyb11 31023 estExt_Genewi	TYEGTNDVHA	LILGKAITGI	PAFS-					
RO3G_01095.3	TYEGTHDVHA	LILGKAITGI	PAPAN					
Consensus	TYEGT DVHA	LILGKAITGI	PAF					

Abb. 4.42 Proteinsequenzen für A4 (Acyl CoA dehydrogenase) von *Mucor circinelloides* (Mucci), *Phycomyces blakesleeenanus* (Phyb1) und *Rhizopus oryzae* (RO). A4 Vor.: Vorwärtsprimer, A4 Rück: Rückwärtsprimer

4.3.22.2 Amplifikation des DNA- Fragments A4

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 257 bp, was hier ungefähr der Größe der unteren resultierenden Bande entspricht (Abb. 4.43). Die untere Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert. Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 6 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das A4- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15).

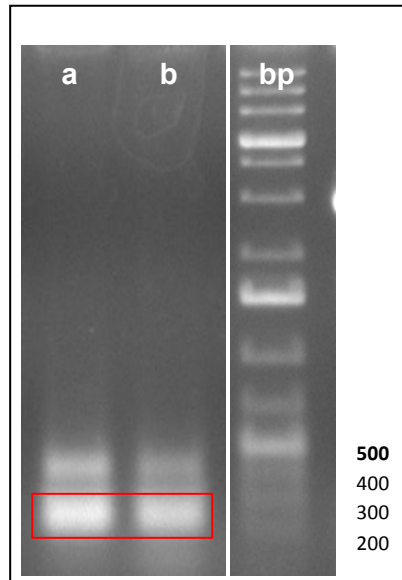


Abb. 4.43 a: Markierung: PCR-Produkt von A4 Mm(-), b: Markierung: PCR-Produkt von A4 Mm(+)

Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das A4- Insert befand.

In Abb. 4.44 ist ersichtlich, dass eine der Kolonien ein Plasmid mit einem A4- Insert enthält. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) hatten kein Fragment dieser Größe. Nur für das aus dem Gel isolierten (-)- PCR-Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurde der Klon A4(-)5 sequenziert.

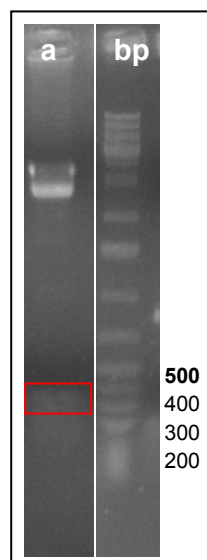


Abb. 4.44 Markierung: Klon A4(-)5

4.3.22.3 Sequenz des A4(-)5 Fragments

CTGCAGCATCATTATCATTCCGTGATGGAAGCACGCAAAGAGAATTTACCCTTG
ATAGCAGGTGCTTCTAAACCGGGCATCCCCTTTTCTAAAATAAATCCACGAATCG
CTCCACCTTCATCTAGGTTCTTGGCCCAAATCACAAAGACATCGGCAATAGGTG
AGTTGGTGATCCATGTCTTGGATCCGTTCAAGACGTAGTGTCCGTTTACTTTACG
AGCAGTGGTTTCCATACCTGCAGGATCAGAA^{CCATGATTTGGCTCGAATTC}

Rot ist hierbei die Sequenz des A4- Rückwärtsprimers markiert, grün die Sequenz des Vorwärtsprimers. Die Sequenz wurde mit der Datenbank des Joint Genome Institutes und der NCBI abgeglichen und die Identität dieses Fragments als „Acyl-CoA dehydrogenase“ bestätigt.

4.3.23 A7: S-adenosylmethionine synthetase

S-Adenosylmethionin (AdoMet) Synthetase ist ein Enzym, das die Bildung von AdoMet aus Methionin und ATP katalysiert. AdoMet ist ein wichtiger Methyl donor für die Transmethylierung und der Propylaminodonor in der Synthese von Polyaminen (Cantoni, 1953).

4.3.23.1 Konstruktion der Primer

Die vollständige Proteinsequenz von *Mucor circinelloides* wurde mit den Proteomen von *Rhizopus oryzae* und *Phycomyces blakesleeenanus* abgeglichen. Diese drei Sequenzen wurden aligniert und nach Konsensussequenzen gesucht, durch die Vorwärts- und Rückwärts- Primer gelegt werden können, um das DNA- Fragment zu amplifizieren. Durch die in Abb. 4.45 rot markierten Sequenzen wurden die degenerierten Primer gelegt, deren Sequenzen unter 2.5.1 aufgeführt sind.

4.3.23.2 Amplifikation des DNA- Fragments A7

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 45 °C und 35 Zyklen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 12,5 ng DNA (*Mucor mucedo* (-) und (+)) und 10 pmol Primer eingesetzt. Das zu erwartende Fragment hat eine kalkulierte Größe (bei *Mucor circinelloides*) von 880 bp.

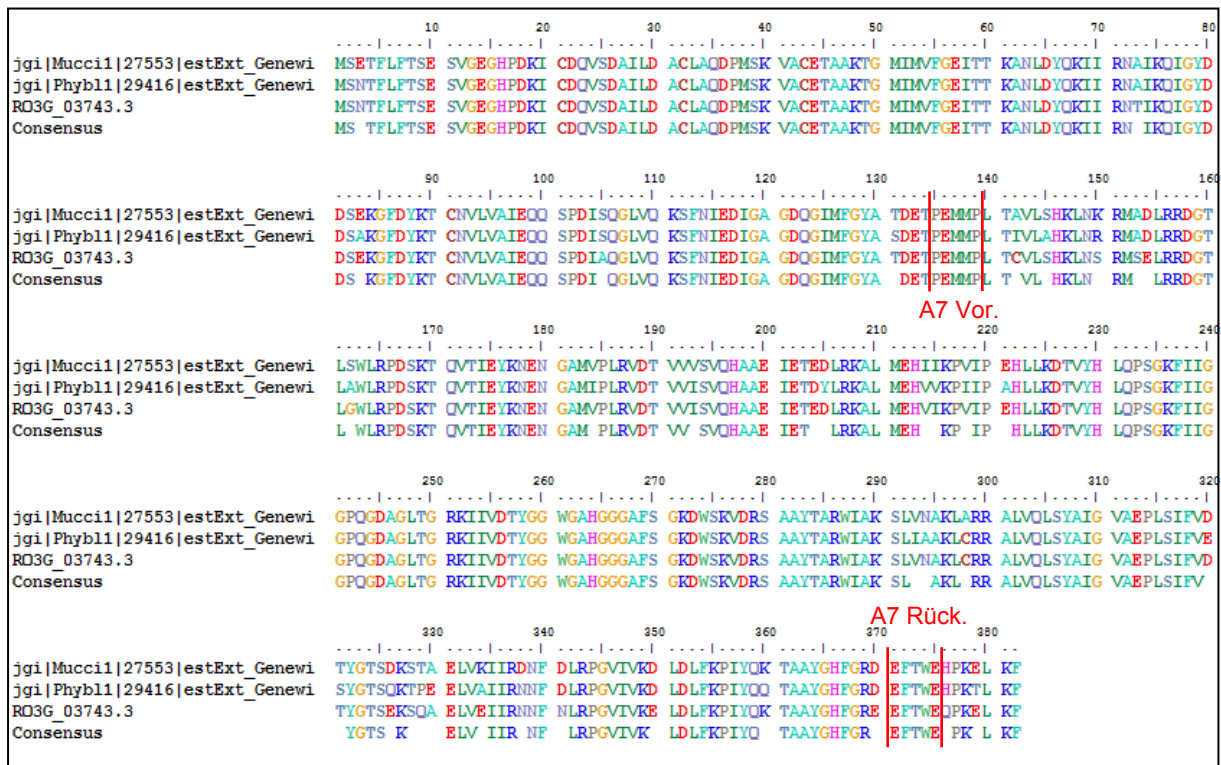


Abb. 4.45 Proteinsequenzen für A4 (Acyl CoA dehydrogenase) von *Mucor circinelloides* (Mucci), *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl) und *Rhizopus oryzae* (RO). A7 Vor.: Vorwärtsprimer, A7 Rück: Rückwärtsprimer

Da bei dieser PCR mehrere Amplifikationsprodukte entstanden (Abb. 4.46), wurde nur die markierte Bande ausgeschnitten und wie unter 3.14 beschrieben aus dem Gel eluiert.

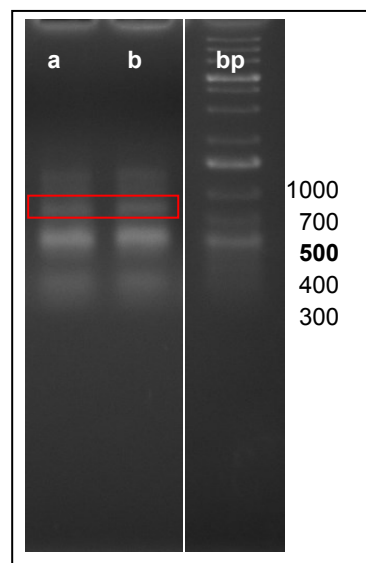


Abb. 4.46 a: Markierung: PCR-Produkt von A7 Mm(-); b: Markierung: PCR-Produkt von A7 Mm(+)

Die aus dem Agarosegel gereinigten PCR- Fragmente wurden in den Vektor pTZ19R kloniert (3.15 – 3.16) und in *E.coli* transformiert (3.17). Pro Transformationsansatz wurden 18 *E.coli* Kolonien untersucht, von denen je eine Plasmidpräparation durchgeführt wurde (3.18). Nach der Plasmidpräparation wurden die präparierten Plasmide, in denen sich nun das A7- PCR Produkt befand, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI verdaut, an deren Schnittstellen zuvor das Fragment in den Vektor pTZ19R kloniert wurde (2.6, 3.15). Dies wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich in einem der präparierten Plasmide das A7- Insert befand. In Abb. 4.47 ist ersichtlich, dass vier der Kolonien ein Plasmid mit einem A7- Insert enthalten. Die übrigen Klone (hier nicht gezeigt) hatten kein Fragment dieser Größe. Sowohl für das aus dem Gel isolierten (-)- PCR-Fragment als auch das (+)-Fragment war die Klonierung in den Vektor pTZ19R erfolgreich. In einem nächsten Schritt wurden die Klone A7(-15), A7(-)16, A7(+) 15 und A7(+)18 sequenziert.

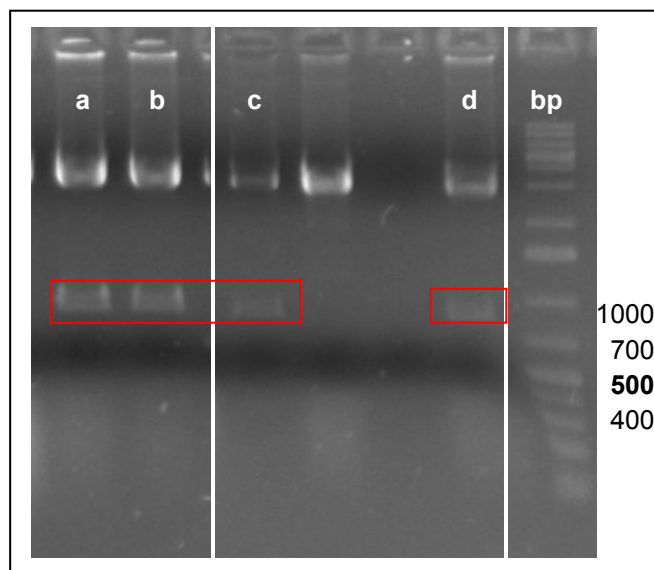


Abb. 4.47 a: Markierung: Klon A7(-15), b: Markierung: A7(-)16, c: Markierung: A7(+)15, d: Markierung: A7(+)18

4.3.23.3 Sequenzen der Klone A7(-15), A7(-)16, A7(+) 15 und A7(+)18

Obwohl alle sequenzierten Klone ein Insert der richtigen Größe hatten, konnte bei keinem eine Sequenzübereinstimmung mit der S-Adenosylmethionin Synthetase gefunden werden. Aus diesem Grund muss das Experiment in Zukunft wiederholt werden, bevor mit einem korrekten Klon weiter gearbeitet werden kann.

4.4 Sequenzvergleiche mit Dikarya und Mucoromycotina

Die unter 4.3 gefundenen *Mucor mucedo* DNA-Sequenzen wurden mit der DOE Joint Genome Institute-Datenbank abgeglichen. Dabei wurden die Sequenzvergleiche auf Dikarya und Mucoromycotina beschränkt.

4.4.1 Sequenzvergleich von z9

In Abb. 4.48 wird deutlich, dass das Fragment z9 „predicted protein“ in ca. der Hälfte der Sequenz sowohl mit *Mucor circinelloides* als auch mit *Phycomyces blakesleeanus* übereinstimmt. Hierbei ist die Übereinstimmung mit *M. circinelloides* deutlich höher als mit *P. blakesleeanus*. Für Basidiomyceten und Ascomyceten fand sich keine entsprechende Sequenz in der DOE Joint Genome Institute- Datenbank.

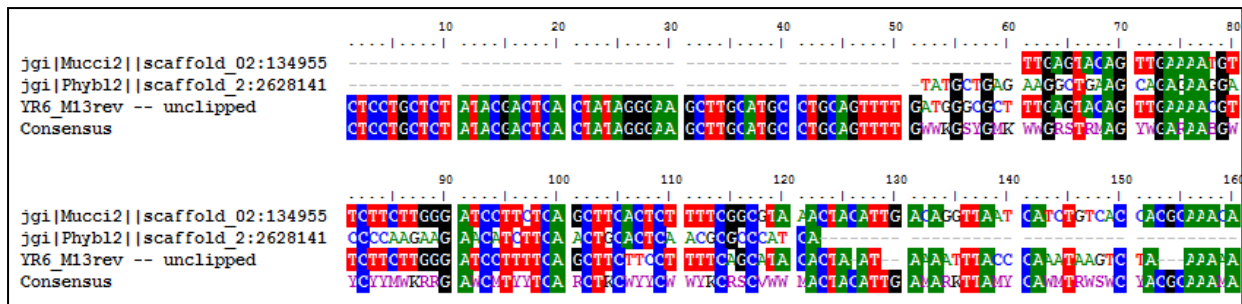


Abb. 4.48 Vergleich des *Mucor mucedo* z9 Fragments (YR6_M13rev) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeanus* (Phybl).

4.4.2 Sequenzvergleich von d3

In Abb. 4.49 sind die für dieses Fragment in der Datenbank gefundenen Sequenzen aligniert worden. Die Konsensussequenz zeigt nur geringe Übereinstimmungen in allen 10 Sequenzen, was auch daran liegen mag, dass die Gensequenz teilweise nur als Fragment vorliegt.

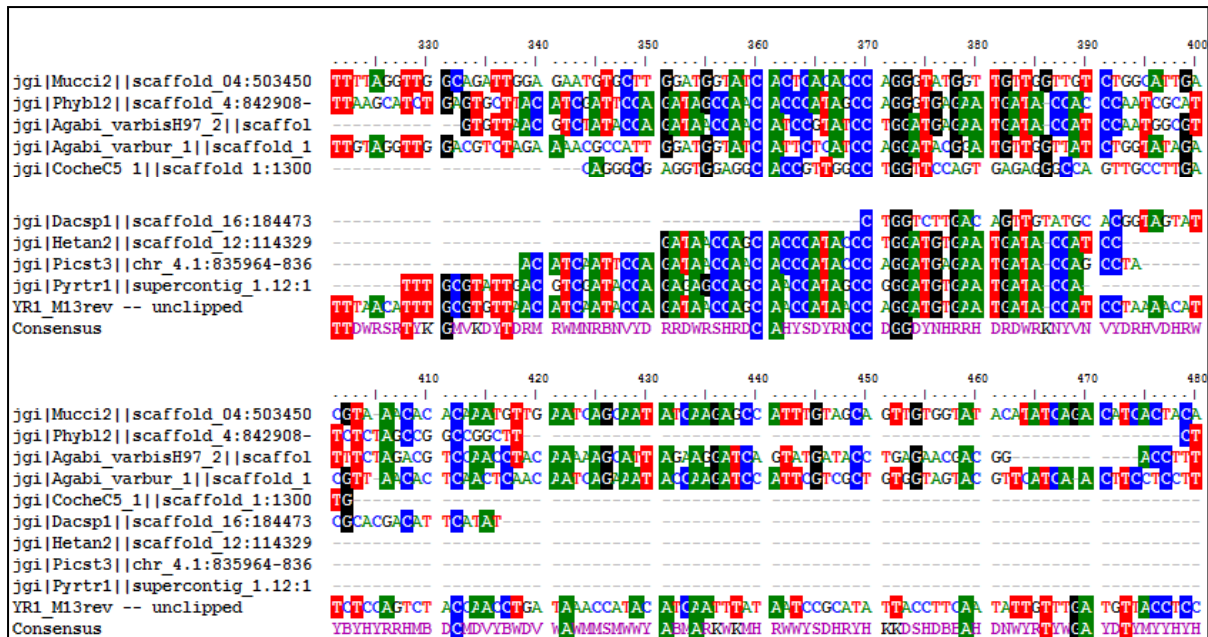


Abb. 4.49 Vergleich des Mm d3 Fragments (YR1_M13rev) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phyb1), sowie den Basidiomyceten *Agaricus bisporus* (Agabi), *Dacryopinax* sp. (Dacsp1), *Heterobasidion annosum* (Hetan2) und den Ascomyceten *Cochliobolus heterosporus* (CocheC5), *Pichia stipitis* (Picst3) und *Pyrenophora tritici-repentis* (Pyrtr1).

4.4.3 Sequenzvergleich von d7

Für das Fragment des Klons d7(-)4 „hypothetical protein“ konnte in keiner Datenbank eine Übereinstimmung gefunden werden.

4.4.4 Sequenzvergleich von d10

In Abb. 4.50 sind die für dieses Fragment in der Datenbank gefundenen Sequenzen aligniert worden. Für die in der DOE Joint Genome Institute- Datenbank aufgeführten Basidiomyceten und Ascomyceten ließen sich keine übereinstimmenden Sequenzen für das Fragment d10 „Stomatin“ finden. Die Abweichungen selbst innerhalb derselben Gattung sind, wie Abb. 4.50 zeigt, doch erheblich. So unterscheiden sich *Mucor mucedo* und *Mucor circinelloides* stärker voneinander als *Mucor mucedo* und *Phycomyces blakesleeenanus*.

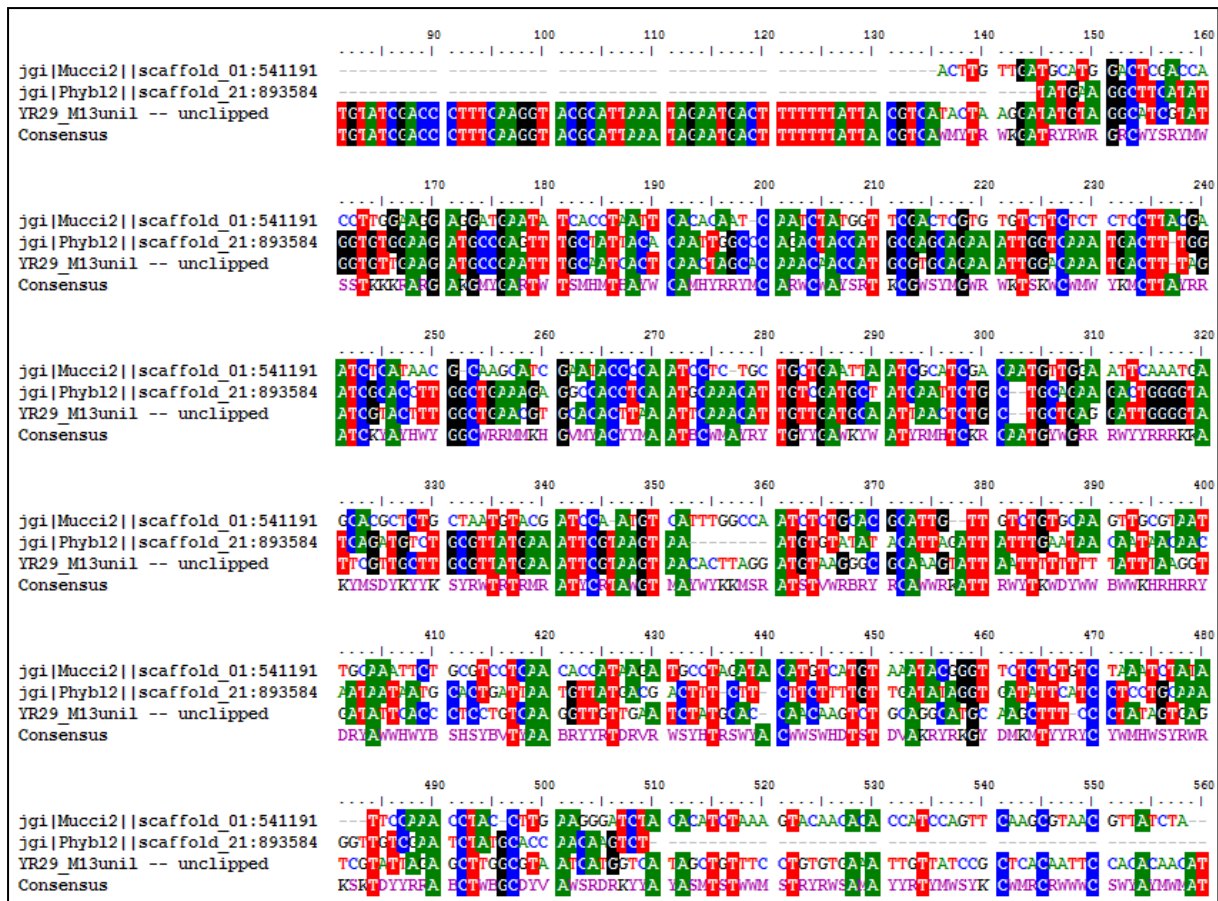


Abb. 4.50 Vergleich des *Mucor mucedo* d10 Fragments (YR29_M13unil) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenae* (Phybl).

4.4.5 Sequenzvergleich von A2

In Abb. 4.51 wird deutlich, dass das Fragment A2 „Malatdehydrogenase“ nur wenige Übereinstimmungen im abgeglichenen Sequenzbereich besitzt, die sich durch alle überprüften Organismen ziehen. Hier sind die Übereinstimmungen zwischen den Arten der Zygomyceten am größten, bei den Basidiomyceten bzw. Ascomyceten wechseln die übereinstimmenden Nucleotide je nach Art.

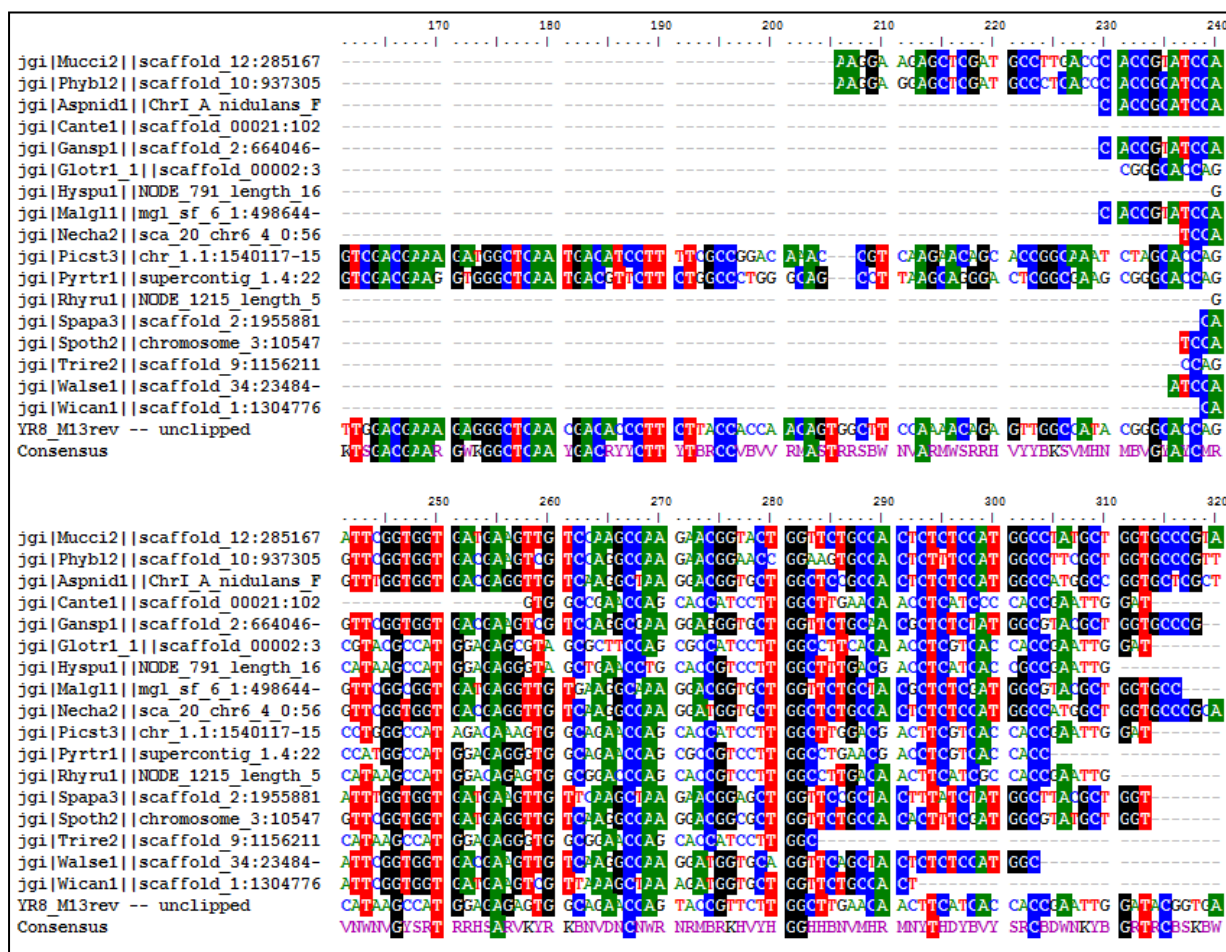


Abb. 4.51 Vergleich des *Mucor mucedo* A2 Fragments (YR8_M13rev) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl), sowie den Basidiomyceten *Ganoderma sp* (Gansp1), *Gloeophyllum trabeum* (Glotr1_1), *Malassezia globosa* (Malgl1), *Wallermia sebi* (Walse1) und den Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (Aspnid5), *Candida tenuis* (Cante1), *Hysterium pulicare* (Hyspu1), *Nectria haematococca* (Necha2), *Pichia stipitis* (Picst3), *Pyrenophora tritici-repentis* (Pyrtr1), *Rhytidhysterium rufulum* (Rhyru1), *Spathaspora passalidarum* (Spapa3), *Sporotrichum thermophile* (Spath2), *Trichoderma reesei* (Trire2) sowie *Wickerhamomyces anomalus* (Wican1).

4.4.6 Sequenzvergleich von A3

Abb. 4.52 zeigt, dass das Fragment A3 „Malatdehydrogenase“ in einem Bereich zwischen 300 – 335 einige Übereinstimmungen mit den überprüften Zygo- Basidio- und Ascomyceten hat. Einzig *Cochliobolus heterostrophus*, *Cryptococcus neoformans* und *Serpula lacrymans* haben eine geringere Übereinstimmung.

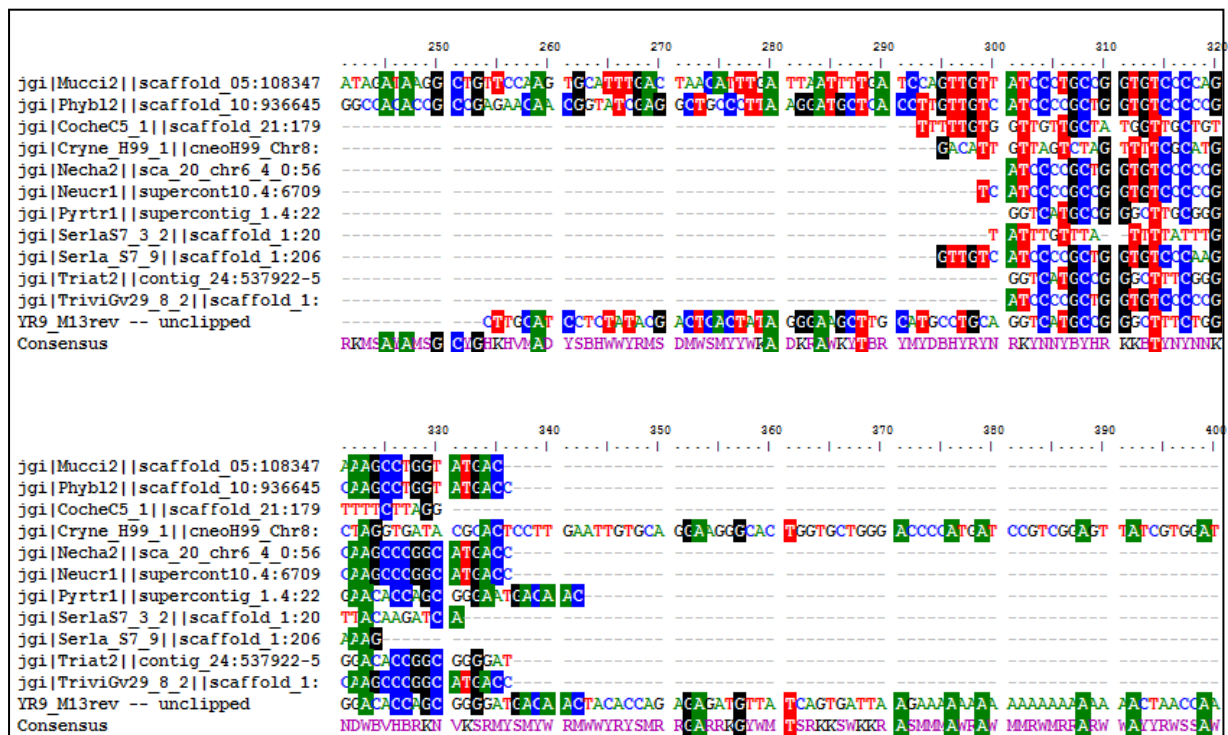


Abb. 4.52 Vergleich des *Mucor mucedo* A3 Fragments (YR9_M13rev) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl), sowie den Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* (Cryne_H99), *Serpula lacrymans* (SerlaS7) und den Ascomyceten *Cochliobolus heterostrophus* (CocheC5), *Nectria haematococca* (Necha2), *Neurospora Crassa* (Neucr1), *Pyrenophora tritici-repentis* (Pyrtr1), *Trichoderma atroviride* (Triat2) und *Trichoderma virens*.

4.4.7 Sequenzvergleich von A4

In Abb. 4.53 wird deutlich, dass ungefähr ein Drittel des Abschnitts, bei dem in allen drei Arten ein Sequenzfragment verfügbar ist, eine Konsensussequenz vorhanden ist. Diese wird allerdings immer wieder durch ein bis drei Nucleotide unterbrochen, in denen die Sequenzen nicht miteinander übereinstimmen.

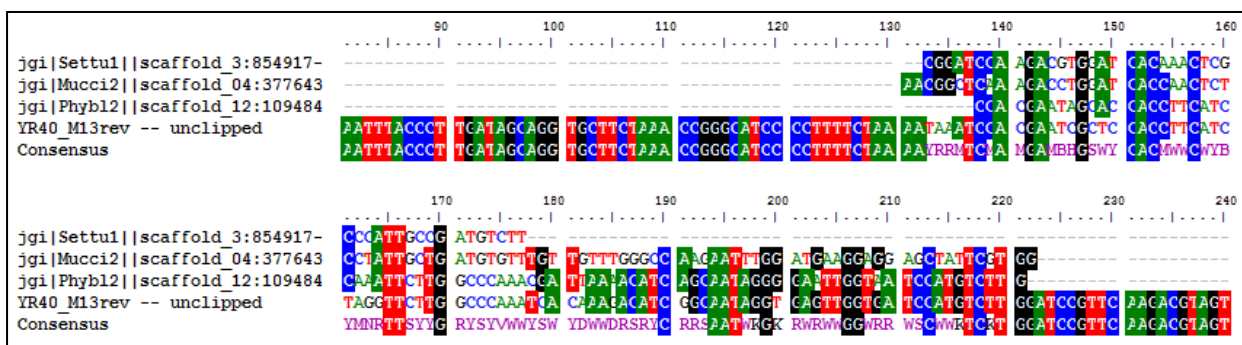


Abb. 4.53 Vergleich des *Mucor mucedo* A4 Fragments (YR40_M13rev) mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides* (Mucci) und *Phycomyces blakesleeenanus* (Phybl), dem Ascomyceten *Setosphaeria turcica* (Settu1).

4.5 Random Amplified Polymorphic DNA – PCR (RAPD-PCR)

RAPD-PCR wurde zunächst für DNA-Fingerprints zur genetischen Analyse entwickelt (Williams et al., 1990). Später wurde dieses Verfahren jedoch weiter entwickelt und unter dem Namen RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) an die RNA-Fingerprintanalyse angepasst (Welsh et al., 1992).

Um DNA zu analysieren, deren Sequenz unbekannt ist, werden zufällige Primer von einer Länge von etwa 10 Basen verwendet. Unter den richtigen Bedingungen erhält man mehrere Banden unterschiedlicher Größe, Anzahl und Ausprägung. Deren Sequenz ist zwar weiterhin nicht bekannt, doch kann man durch einen Vergleich des Bandenmusters Unterschiede zwischen Individuen, Stämmen oder Spezies nachweisen (aus: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics; Spektrum, 6. Auflage, 2009).

Im vorliegenden Fall soll geklärt werden, ob und in welchem Umfang sich die beiden *Mucor mucedo* – Stämme (-) und (+) auf genomischer Ebene unterscheiden. Da sie auf Proteinebene nur minimale Unterschiede aufweisen (vergl. Abb. 4.1-4.3), soll geklärt werden, ob sich dies auf geringe Differenzen im Genom zurück führen lässt oder ob die große Übereinstimmung auf Proteomebene auf eine Regulation in der Genexpression zurück zu führen ist. Als Vergleichsorganismus wird hier *Absidia glauca* (-) und (+) mitgeführt. *Absidia glauca* ist ein Vertreter der Mucoraceen der Klasse der Zygomyceten (Teepe et al., 1988).

Die Sequenzen der für die RAPD-PCR verwendeten Primer sind unter 2.5.1 aufgeführt. Die Primer mit "P" – Bezeichnung wurden von Herrn J. Wöstemeyer (Friedrich Schiller Universität Jena) zur Verfügung gestellt (Schäfer und Wöstemeyer 1992). Die anderen Primer stammen von Dr. J. van Kann, Landwirtschaftliche Universität Wageningen, NL sowie aus Klein-Lankhorst *et al.* (1991) und Van der Vlugt-Bergmans *et al.* (1993)

Die RAPD-PCR wurden bei 42 °C Annealingtemperatur und 35 Zyklen durchgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass bei *Mucor mucedo* sehr große Unterschiede zwischen dem (-) und dem (+) Typ herrschen (Abb. 4.54). Bei *Absidia glauca* hingegen sind nur vier Banden zu erkennen, die sich in den beiden Kreuzungstypen unterscheiden (Abb. 4.55).

Bei *Mucor mucedo* finden sich 14 identische Banden (es wurden nur die eindeutig vorhanden Banden gezählt), 15 Banden wurden insgesamt gefunden, die bei (-) und

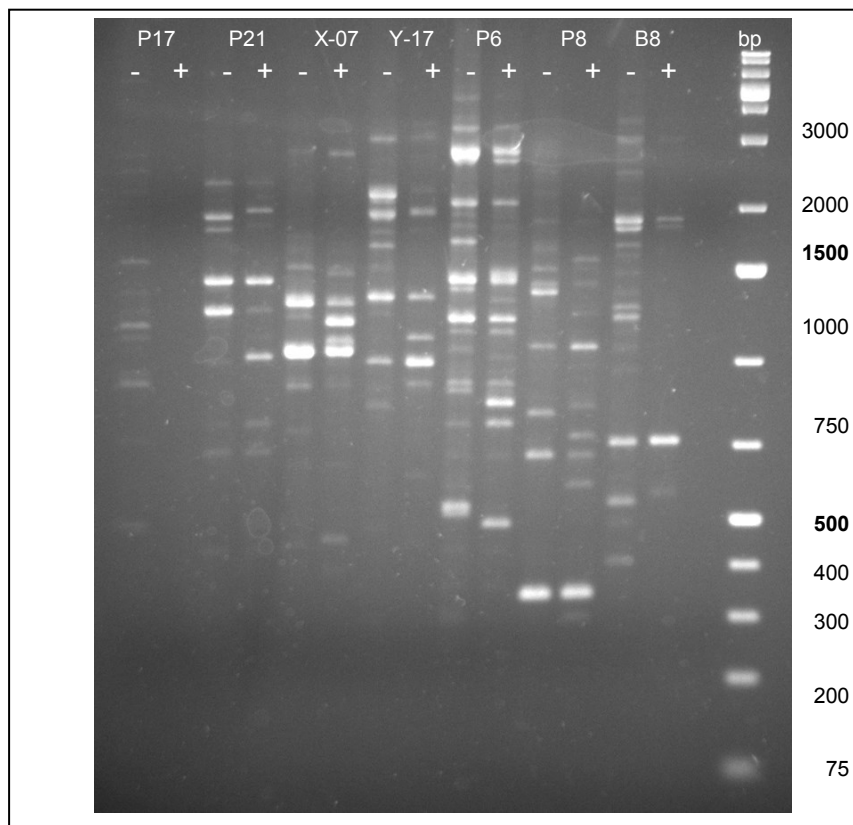


Abb. 4.54 *Mucor mucedo* (-) und (+) Kreuzungstyp; P17, P21, X-07, Y-17, P6, P8, B8: eingesetzte Primer, siehe 2.5.2

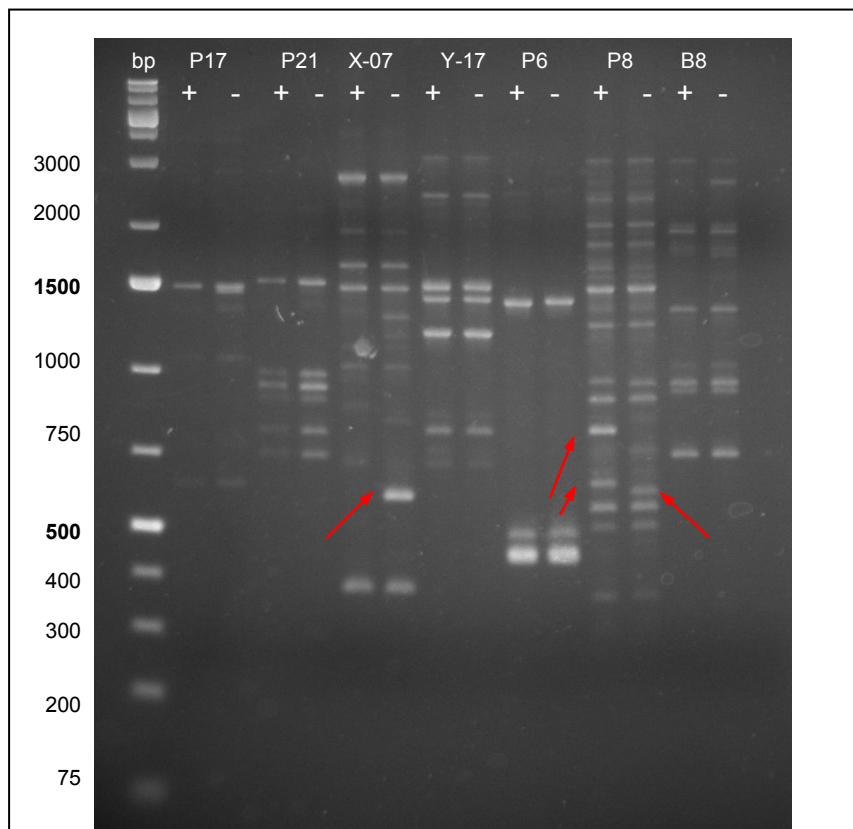


Abb. 4.55 *Absidia glauca* (-) und (+) Kreuzungstyp: P17, P21, X-07, Y-17, P6, P8, B8: eingesetzte Primer, siehe 2.5.2
Markierungen: Unterschiede zw. (-) und (+) Kreuzungstyp

(+) nicht übereinstimmen (Abb. 4.54). Dadurch ergibt sich eine Übereinstimmung von 48,3 %.

Absidia glauca hingegen zeigt eine Übereinstimmung von 89,1 %. Es sind hier 33 identische und nur 4 nicht identische Banden vorhanden (Abb. 4.55).

4.6 Zellwandglykosylierung von *Mucor mucedo*

Ebenso unbekannt wie die Beteiligung der Proteine an sexueller Kommunikation ist die mögliche Beteiligung weiterer Zellwandkomponenten von *Mucor mucedo* an der Erkennung des komplementären Kreuzungspartners. Es ist möglich, dass verschiedene Arten der Zellwand-Glykosylierung bei diesem Vorgang ebenso eine Rolle spielen wie Zellwand – assoziierte Proteine.

Bei *Chlamydomonas reinhardtii* resultiert eine Mutation in der O-Glykosylierung des *mt* (mating type locus) in Sterilität des (-) Kreuzungspartners (Vallon, Wollman, 1995). Vermutlich benötigt die Komponente des *mt*⁺ Apparates diese bestimmte O-Glykosylierung für die sexuelle Interaktion.

Es ist durchaus möglich, dass auch bei Pilzen, in diesem Fall bei *Mucor mucedo*, Polysaccharide der Zellwand nötig für die Erkennung des komplementären Kreuzungspartners sind. Daher wurden einige dieser Bestandteile durch HPLC analysiert.

4.6.1 HPLC

Die Proben für die HPLC – Analyse wurden wie unter 3.22 beschrieben aufbereitet und analysiert.

Dabei wurden folgende Wachstumsstadien untersucht: Mm (-) Bodenmyzel, Mm(+/-) Bodenmyzel, Mm(+) Bodenmyzel, Mm(-) Sporangien, Mm(+/-) Zygothoren, Mm(+) Sporangien.

Die Zellwandproben wurden auf die Präsenz von Glucosamin, Glucose und Mannose untersucht. Es wurden vier HPLC-Durchläufe mit je 3 Aliquots der zu analysierenden Stadien durchgeführt.

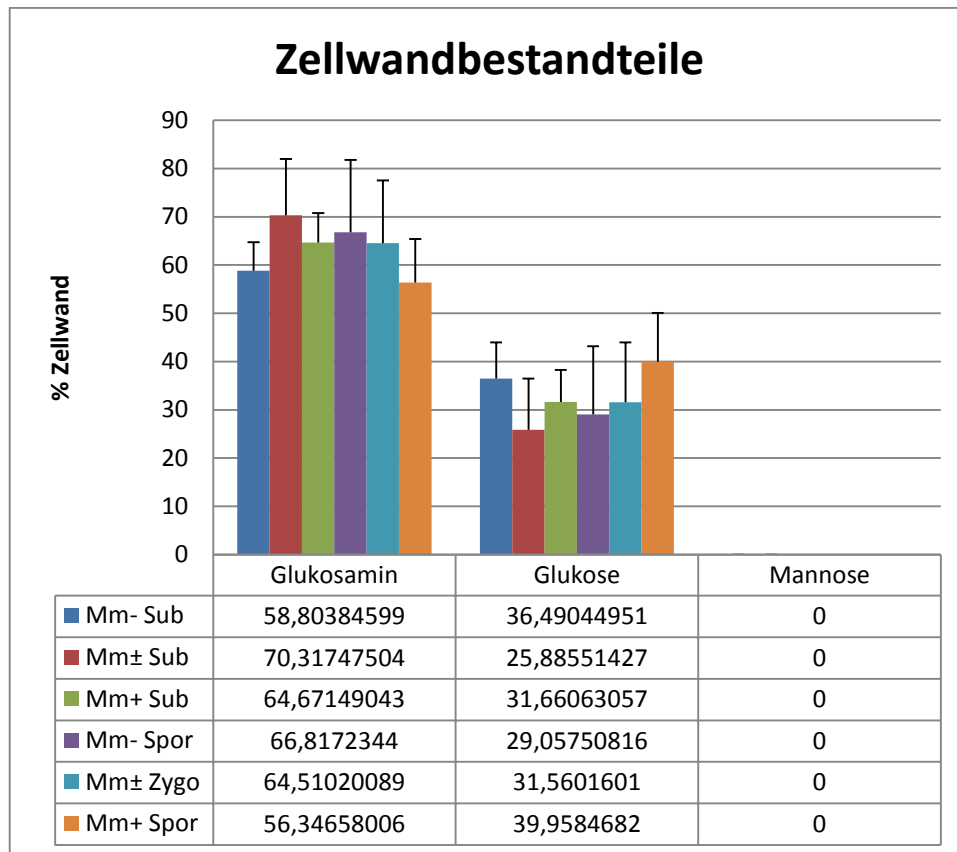


Abb. 4.56 HPLC- Ergebnisse von *Mucor mucedo*; Durchschnittswerte von 3 HPLC-Durchgängen.
Mm: *Mucor mucedo*; Sub: Substratmyzel; Spor: Sporangien-Stadium; Zygo: Zygosporen-Stadium.

Der Durchschnitt dieser vier HPLC-Analysen zeigt, dass Glukosamin, woraus Chitin besteht, zwischen 55 % und 70 % der untersuchten Bestandteilen der Zellwand von *Mucor mucedo* ausmacht (Abb. 4.56). Dabei gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien oder Kreuzungspartnern. Glukose hat einen Anteil von 25% - 40% an der Zellwand, Mannose hingegen ist nicht vorhanden.

4.6.2 Zellwandfärbungen

Diese Ergebnisse wurden verifiziert durch Polysaccharid-spezifische Zellwandfärbungen.

4.6.2.1 Mannosenachweis

Das Myzel wurde zunächst mit Calcofluorwhite, das die Chitinschicht anfärbt, und Concanavalin A, das an Mannose bindet, behandelt (3.20).

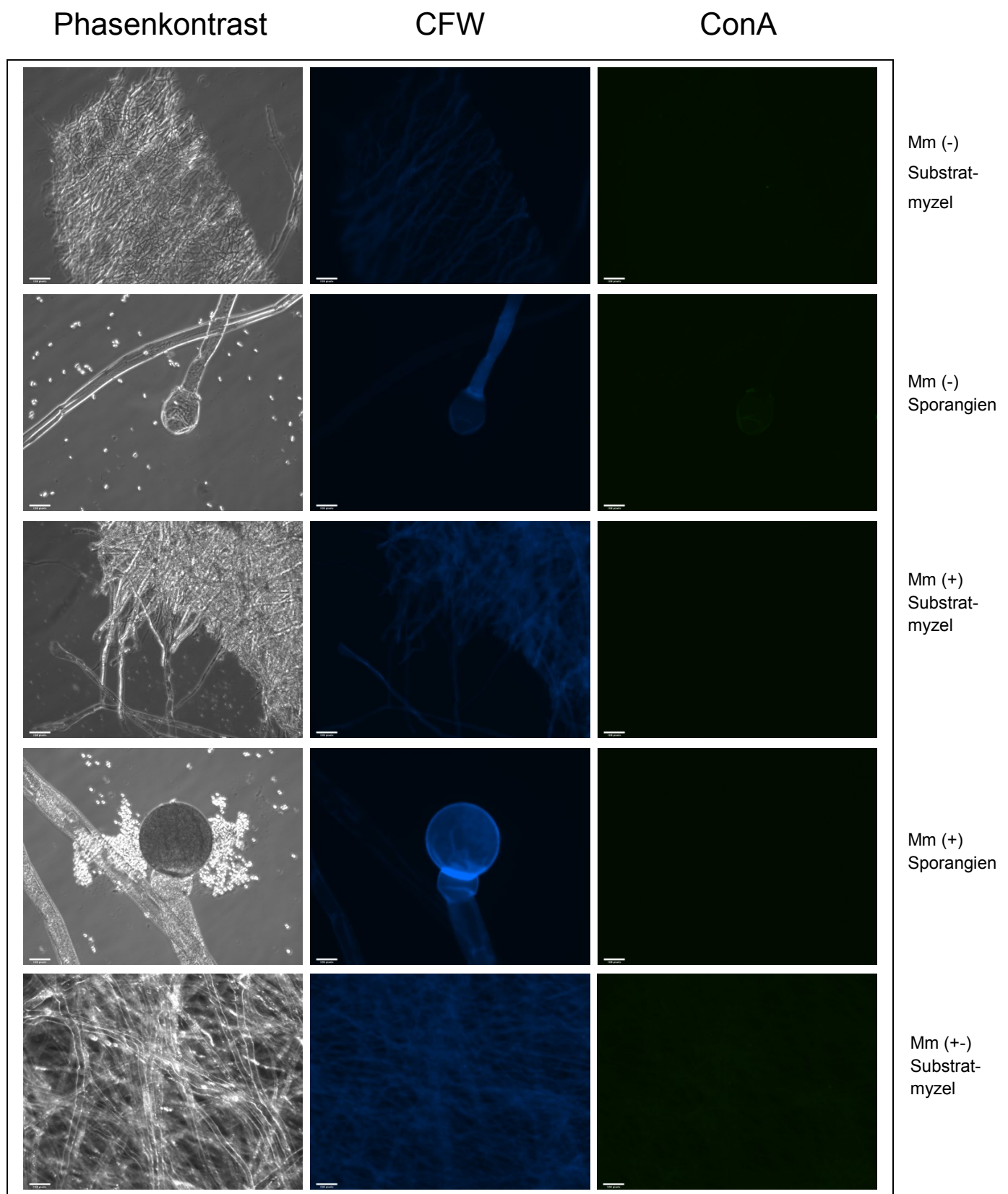
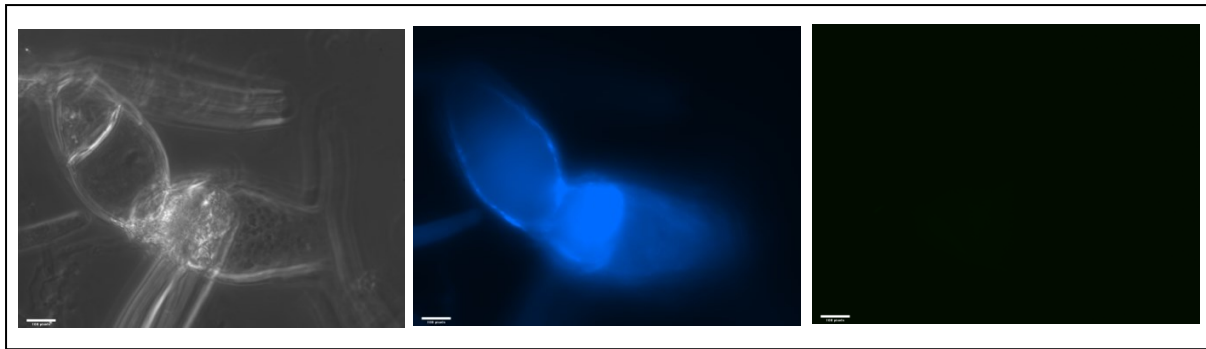


Abb. 4.57 Zellwandfärbungen von *Mucor mucedo* (-), (+) und Kreuzkulturen in verschiedenen Stadien mit Calcofluorwhite (CFW) und ConcanavalinA (ConA). Mm: *Mucor mucedo*. Fortsetzung S.95.



Mm (+-)
Zygophoren

In Abb. 4.57 wird erneut deutlich, dass *Mucor mucedo* in keinem Entwicklungsstadium eine Mannoseschicht besitzt, wohingegen Chitin sowohl in vegetativem Myzel als auch in den asexuellen und sexuellen Strukturen besonders ausgeprägt ist.

4.6.2.2 Glukosefärbungen

Mucor mucedo (-) und (+) wurde in den Stadien Substratmyzel, Sporangien und Zygosporien mit „Wheat Germ Agglutinate“ angefärbt, welches sich in die Glukoseschicht der Zellwand einlagert. Auf den Fotos (hier nicht gezeigt) sind nur geringe Färbungen zu erkennen. Als Kontrollfärbung wurde wiederum Calcofluorwhite eingesetzt.

4.6.2.3 Chitosanfärbungen

Zur weiteren Differenzierung zwischen Chitin und Chitosan wurde das Myzel mit Eosin Y gefärbt, das spezifisch an Chitosan bindet (Baker et al., 2007).

Hier ist deutlich zu sehen, dass Chitosan in den frühen Entwicklungsstadien des vegetativen Myzels und der Zygophoren im Vergleich zu Chitin nur schwach ausgeprägt ist (Abb. 4.58). Ist jedoch das Stadium der Gametangien erreicht, bildet sich nach der Abschnürung der Zellwand in einem der Kreuzungspartner Chitosan in der Zellwand dieses Kompartiments. Im weiteren Verlauf der Zygosporienentwicklung weitet sich der Bereich der Chitosanbildung auf die Zygospore und den anderen Kreuzungspartner aus, allerdings bleibt der Bereich limitiert auf die Suspensoren der beiden Kreuzungspartner. Ob *Mucor mucedo* (+) oder (-) zuerst mit der Chitosanbildung beginnt, ist noch unbekannt. Es ist jedoch der Partner, der ein minimal kleineres Gametangium ausbildet.

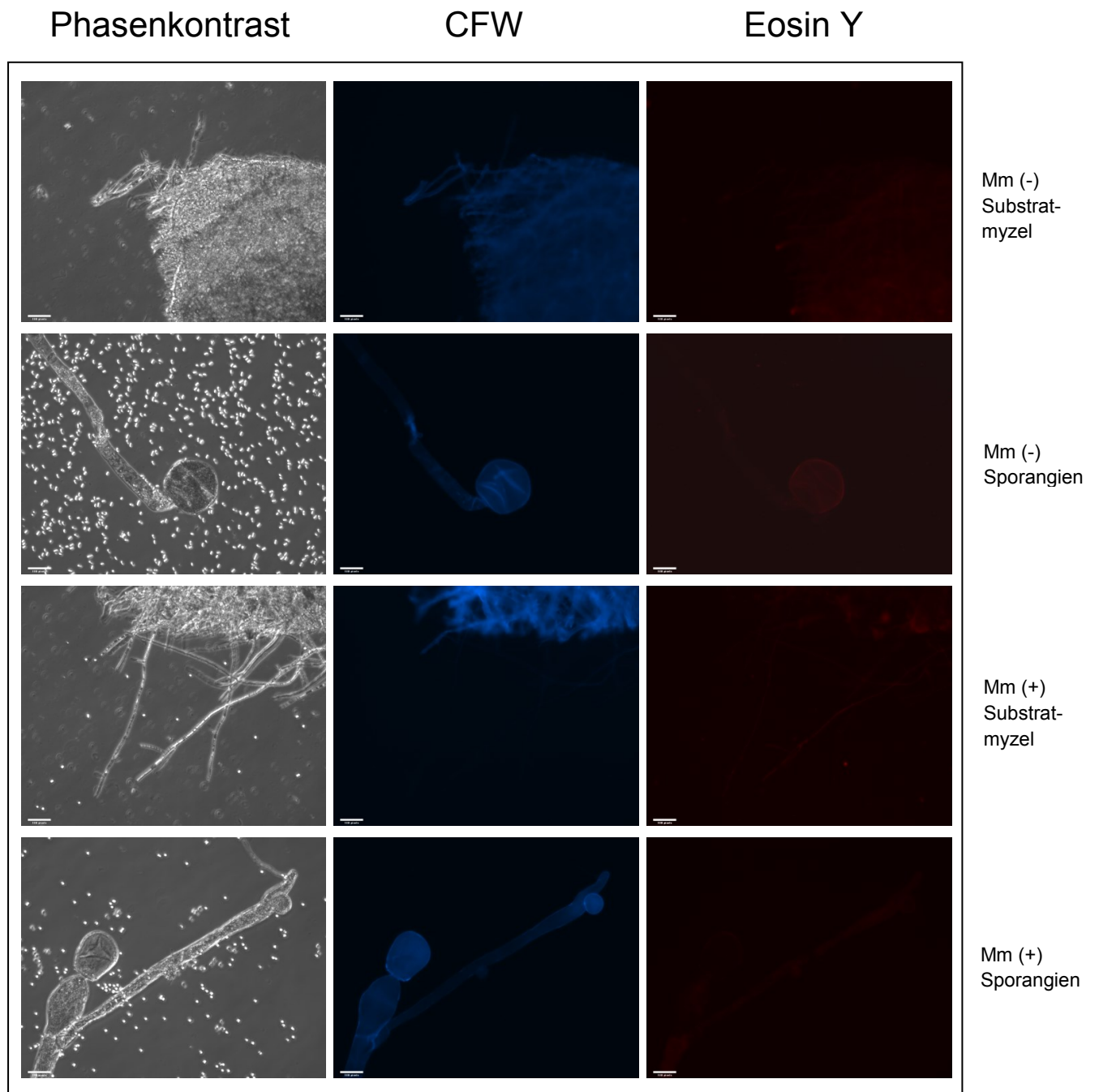


Abb. 4.58 Chitosanfärbung mit EosinY in verschiedenen Stadien der Reinkulturen *Mucor mucedo* (-) und (+). CFW: Calcofluorwhite, Mm: *Mucor mucedo*

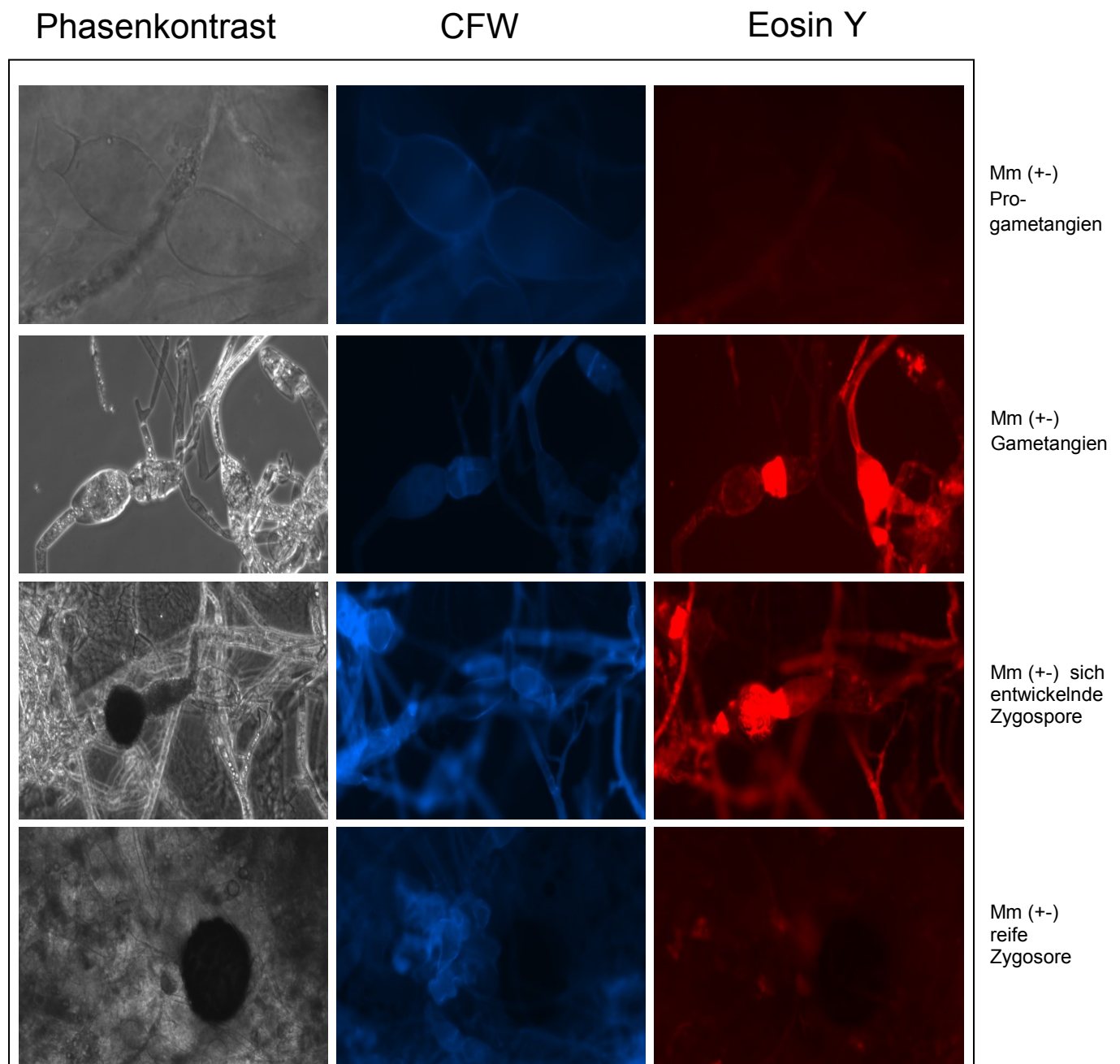


Abb. 4.59 Chitosanfärbung mit EosinY der Kreuzkulturen von *Mucor mucedo* (-) und (+).
CFW: Calcofluorwhite, Mm: *Mucor mucedo*

5 Diskussion

5.1 2D-Gele

5.1.1 Zellwand-assoziierte Proteine

Es gibt verschiedene Kategorien von Zellwandproteinen. Sie sind entweder kovalent durch eine glykosidische- oder Esterbindung mit Zellwandpolysacchariden verbunden oder über Disulfidbrücken mit anderen Zellwandproteinen. Sie können auch nicht-kovalent mit Zellwandpolysacchariden assoziiert sein, beispielsweise mit einer Glycan-bindenden Domäne. Ebenso können sie aufgrund der Phosphodieestergruppen in den O- und N- gebundenen Kohlenhydratseitenketten der Zellwandglykoproteine ionisch an eine der vielen negativen Ladungen gebunden sein (Klis et al., 2006; Gemmill et al., 1999). Ionisch gebundene Zellwandproteine beinhalten oft nicht-glykosylierte Proteine von zytosolischem Ursprung (Nombela et al., 2006; Urban et al., 2003).

In *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* werden über 20 verschiedene Zellwandglykoproteine vermutet. Zellwandglykoproteine spielen bei vielen Funktionen eine Rolle (De Groot et al., 2004). Durch das Kreuzverbinden von Polysacchariden tragen sie zur Zellwandintegrität bei und verhindern den Zugang von Glycanasen anderer Organismen zu den eigenen Polysacchariden (Klis et al., 2006). Sie spielen bei der Paarung (Dranginis et al., 2007) und Biofilmbildung auf biotischen und abiotischen Oberflächen eine Rolle (Douglas 2003; Li et al., 2007), vermitteln die Adhäsion an Epithelzellen (Li et al., 2007), vermitteln bei der Endozytose und Gewebeinvasion (Phan et al., 2007) und verursachen proteolytischen Schaden am invasierten Gewebe (Albrecht et al, 2006).

Der Aufbau der Zellwand von *Mucor spp.* ist kaum bekannt. In einer Veröffentlichung von Bartnicki-Garcia (1968) wurde die chemische Zusammensetzung der Zellwand von *Mucor rouxii* untersucht. Die Hauptbestandteile sowohl der Hefen- als auch Hyphenform sind Chitin- und Chitosanfibrillen, die in eine Matrix aus Glykoproteinen und Glykopeptiden eingebettet sind. Unter den Zellwandkomponenten waren bei der Hyphenform unter anderem 9.4 % Chitin, 32.7 % Chitosan, 1.6% Mannose, 11.4 % Glucuronsäure und 6.3 % Protein festgestellt worden. Eine weitere Aufschlüsselung der Zelloberflächenproteine ist für *Mucor rouxii* nicht bekannt.

Bei dem Zygomyceten *Absidia glauca* wurde an der Zelloberfläche des (+)-Kreuzungstyp ein Protein gefunden, das beim (-)- Kreuzungstyp nicht vorhanden ist (Teepe et al., 1988). Es handelt sich hierbei um ein 120-130 Aminosäuren langes Protein mit einer Masse von 15 kDa (Hänfler et al., 1992), das aus einem 1250 bp langen, extrachromosomalen, zirkulären DNA Element translatiert wird.

Bei Hybridisierungsversuchen, in denen (+)- und (-) Typ von *Absidia glauca* zu einem homothallischen Organismus fusioniert wurden (Wöstemeyer et al., 1990), stellte sich heraus, dass fusionierte Kolonien, die Zygoten bildeten, das 15 kDa Protein nicht mehr exprimierten. Vermutlich regulieren die Hybriden die Expression des Oberflächenproteins durch einen Repressionsmechanismus. Diese Repression, die normalerweise für das Fehlen des 15 kDa Proteins im (-) Typ verantwortlich ist, scheint aktiv zu sein, wenn Informationen des (+)- und (-)- Typs in einem Thallus vorhanden ist (Wöstemeyer et al., 1990).

Über diese Experimente hinaus ist wenig über Oberflächenproteine in Zygomyceten bekannt. *Mucor mucedo* wird hier als Modellorganismus benutzt, um mehr über die Vorgänge während der sexuellen Kommunikation beider heterothallischer Partner herauszufinden.

Um zu untersuchen, ob es bereits an der Zelloberfläche von *Mucor mucedo* (-) bzw. (+) Proteine gibt, die bei der Erkennung des komplementären Partners und bei der anschließenden, durch Trisporsäure ausgelösten sexuellen Differenzierung eine Rolle spielen, wurden beide Kreuzungstypen als Reinkultur, sowie als Kreuzkultur angezogen und deren Proteine isoliert (vergl. 3.3). Um den Verlauf der Unterschiede im Proteom beobachten zu können, wurden diese in verschiedenen Stadien isoliert und auf 2D-Gele aufgetragen, um die Unterschiede sichtbar zu machen.

Es wurden die Proteine von *Mucor mucedo* (-), (+) und Kreuzkulturen im Bodenmyzelstadium, im TA-induzierten Myzel (auf dem sich Zygothoren gebildet hatten) und als Kontrolle im nicht- induzierten Myzel (auf dem Sporangien gewachsen waren) isoliert. Da die Trisporsäure zum Besprühen der Kulturen in DMSO gelöst wurde, dienten als Kontrolle mit Lösungsmittel (DMSO) besprühte Kulturen des (-)- und (+)- Typs und den Kreuzkulturen.

Wie in den Abbildungen 4.1 und 4.2 ersichtlich, beschränken sich die Unterschiede jedoch auf Differenzen zwischen (-) und (+) – Typ. Hier sind deutlich verschiedene Punktemuster zu erkennen, während zwischen den Stadien „Bodenmyzel“ (4.1 a-c),

„TA-induziert“ (4.1 d-f) und nicht- induziertem Myzel (4.1 g-i) kaum nennenswerte Unterschiede sichtbar sind. Die einzige Ausnahme bildet Spot 5, der beim TA-induzierten Myzel weniger ausgeprägt ist. Auch werden in den Kreuzkulturen keine weiteren Proteine gebildet, jedenfalls nicht in einer Menge, die auf einem 2D-Gel abbildbar wäre.

Gründe für die nicht vorhandenen Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien sind vermutlich vielfältig. Zum einen mögen durchaus Unterschiede vorhanden sein, jedoch sind diese nicht über eine 2D-Gelelektrophorese zu erkennen, da in diesem Fall die Bildung des entsprechenden Proteins nicht in ausreichender Menge geschehen würde. Um diese Differenzen zu erfassen ist die Vorgehensweise durch 2D-Gelelektrophorese nicht effektiv genug (Gorg et al., 2004).

Ein offensichtlicher Grund mag sein, dass in den untersuchten Stadien bereits alle zur Erkennung des komplementären Partners notwendigen Proteine vorhanden sind. Noch frühere Stadien zu untersuchen ist jedoch schwierig, da dies dann bereits kurz nach dem Auskeimen der Sporen geschehen müsste. Hier Proteine zu isolieren würde sich aufgrund der geringen Ausbeute als kompliziert erweisen.

Die Unterschiede zwischen den Kreuzungstypen sind hingegen in allen Stadien offensichtlich. In den Kreuzkulturen ist eine Mischung aus dem Proteinmuster von (-) als auch von (+) vorhanden, jedoch ohne zusätzlichen Proteinspot. Dies ist nicht überraschend, da die Reinkulturen mit Trisphosphorsäure behandelt worden waren, so dass Zygothorenbildung möglich war. Für die Bildung der Zygothoren in der Kreuzkultur ist offenbar kein weiteres Zellwand-assoziiertes Protein notwendig.

Um diese Unterschiede zwischen den Kreuzungstypen genauer zu bestimmen, wurden die in Abbildung 4.1 markierten Proteinpunkte ausgeschnitten, wie unter 3.10 beschrieben verdaut und anschließend durch MS analysiert.

Die in Abbildung 4.1 a, b, d, e, g und h im basischen Bereich zu sehenden Proteinketten sind vermutlich durch posttranslationale Modifikation (PTM) entstandene Proteinspots des selben Proteins. Der geringe Abstand zwischen diesen Punkten deutet darauf hin, dass sich der isoelektrische Punkt (iP) nur um ein wenig verschoben hat. Da dieselbe Proteinkette in zwei verschiedenen Höhen erscheint, wirken sich die PTMs sowohl auf die Größe als auch auf die Nettoladung dieses speziellen Proteins aus. Dennoch wurden die Proteinpunkte einzeln ausgeschnitten und per MS analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse (vergl. Tabelle

4.1) sind jedoch nicht eindeutig, da die Signifikanz nur zwischen 12 und 39 Prozent lag. Die erhaltenen Sequenzübereinstimmungen dieser Proteinketten mit bereits sequenzierten Proteinen waren für jeden dieser Spots sehr unterschiedlich, folglich auch die Herkunft aus unterschiedlichen Organismen, so dass nicht festgestellt werden konnte, ob es sich bei diesen Proteinketten tatsächlich um ein und das selbe Protein handelt. Dennoch wird in Zukunft versucht werden, im Bereich der zugegebenermaßen geringen Übereinstimmung, Primer für diese(s) Protein(e) zu konstruieren, um herauszufinden, um welche(s) Protein(e) es sich handelt.

5.1.2 Zytoplasmatische Proteine

Ebenso wie die Analyse der Zellwand – assoziierten Proteine ist die Analyse der zytoplasmatischen Proteine wichtig, um herauszufinden, ob und wie die komplementären Partner von *Mucor mucedo* intrazellulär auf das Vorhandensein des (-) bzw. (+) – Typs reagieren. Es ist beispielsweise nichts darüber bekannt, welche zytoplasmatischen Proteine hochreguliert werden (die nicht am Trisporsäuresignalweg beteiligt sind), wenn Trisporsäure die sexuelle Differenzierung aktiviert.

4-Dihydromethyltrisorat Dehydrogenase (TDH), ein Enzym des Sexualhormontransduktionswegs von *Mucor mucedo* katalysiert die Umwandlung des (+) Kreuzungstyp- spezifischen Pheromons 4-Dihydromethyltrisorat zu Methyltrisorat, indem es NADP als Co-Faktor benutzt (Schimek et al., 2005). NADP entsteht beispielsweise während der β -Oxidation der Fettsäuren, im Zitratzyklus, aber auch während der Aktivität der Acyl-CoA Dehydrogenase, die 2,3 Dehydroacyl-CoA unter Verwendung von NADPH zu Acyl-CoA + NADP⁺ katalysiert (Palfey et al., 1998; Ator et al., 1990).

Um zu ermitteln, welche zytoplasmatischen Proteine an der sexuellen Differenzierung beteiligt sind, wurden ebenfalls Proteine von *Mucor mucedo* (-), (+) und Kreuzkulturen im Bodenmyzelstadium, im TA-induzierten Myzel (auf dem sich Zygothoren gebildet hatten) und als Kontrolle im nicht- induzierten Myzel (auf dem Sporangien gewachsen waren) isoliert (wie in 3.2 beschrieben). Genauso dienten hier als zweite Kontrolle mit Lösungsmittel (DMSO) besprühte Kulturen des (-)- und (+)- Typs sowie Kreuzkulturen.

Die hier zu beobachtenden Unterschiede sind noch geringer als bei den Zellwand-assoziierten Proteinen. Es gibt hier ebenfalls nur Abweichungen zwischen (-) - und (+) – Typ, nicht aber zwischen den einzelnen Stadien. Die vorhandenen Unterschiede beschränken sich auf 10 definierte Proteinspots (vergl. Abb. 4.2), die ebenfalls ausgeschnitten und der MS-Analyse unterworfen wurden.

5.2 Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)

Um Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren ist MALDI-TOF eine wichtige, einfach zu benutzende Methode (Albenne et al., 2009). Diese Methode hat gegenüber der N-terminalen Sequenzierung den Vorteil, dass ein eventuell durch N-Acetylaminosäuren, glykosylierte Aminosäuren, Pyrrolidongruppen oder ähnliches blockierter N-Terminus keine Rolle spielt (Georghe et al., 1997).

Peptide wurden im Massenspektrometer fragmentiert und die MS-Spektren gegen Genomdatenbanken von *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus*, bzw. *Rhizopus oryzae* des DOE Joint Genome Institute, CA, USA und des Broad Institute of MIT and Harvard, MA, USA abgesucht.

Die durch das MASCOT-Programm erhaltenen Sequenzübereinstimmungen mit Proteinen aus den Organismen *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Rhizopus oryzae* sind mit Vorsicht zu behandeln.

Da sich die Signifikanz bei den Zellwand-assoziierten Proteinen oft in einem niederen Bereich von 31 – ca. 57 bewegt, ist nicht gewährleistet, dass *Mucor mucedo* tatsächlich für das gefundene Protein ein analoges in seinem Proteom besitzt. Daher wurden für die Konstruktion der Primer auch die entsprechenden Proteinsequenzen von *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides* und *Rhizopus oryzae* herangezogen und auf konservierte Domänen hin verglichen, durch die die Primersequenzen gelegt wurden.

5.3 „A2“ und „A3“ : Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenasen katalysieren die NAD/NADH- abhängige Konversion der Substrate Malat und Oxalacetat. Diese Reaktion spielt eine Schlüsselrolle im Malat/Aspartat Shuttle durch die mitochondriale Membran und im Zitronensäurezyklus

innerhalb der mitochondrialen Matrix. In den meisten Organismen sind die Malatdehydrogenasen dimere Moleküle, einschließlich aller Eukaryoten und den meisten Bakterien. Die Enzyme teilen einen gemeinsamen katalytischen Mechanismus und ihre kinetischen Eigenschaften sind ähnlich, was eine hohe strukturelle Ähnlichkeit beweist. Die dreidimensionalen Strukturen dieser Isoenzyme, die essentiell für die Katalyse sind, sind sowohl in der mitochondrialen als auch der zytoplasmatischen Form der Malatdehydrogenase der Eukaryoten konserviert (Minárik et al., 2002).

Die Malatdehydrogenase ist ein wichtiger Bestandteil des Zitronensäurezyklus (TCA-Zyklus), in dessen Verlauf Pyruvat zu CO_2 oxidiert wird. Weiterhin entstehen während des Ablaufs des TCA- Zyklus 4 NADH, eines davon durch die Oxidation von Malat zu Oxalacetat durch die Malatdehydrogenase. Oxalacetat ist unter anderem notwendig für die Bildung verschiedener Aminosäuren der Aspartat- Familie. Dazu gehören Asparagin, Lysin, Methionin, Threonin und Isoleucin. Oxalacetat ist der Acetylakzeptor des Acetyl- CoA innerhalb des TCA- Zyklus und ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung dieses Kreislaufes (aus: Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, 2009).

Malatdehydrogenasen wurden aus verschiedenen Organismen isoliert, unter anderem aus Eubakterien, Archaeen, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren und aus unterschiedlichen Organellen wie Mitochondrien, Chloroplasten, Glyoxysomen und Peroxisomen (Goward et al., 1994). Es sind multimere Enzyme, die aus identischen Untereinheiten bestehen, die normalerweise entweder als Dimer oder Tetramer organisiert sind. Die Untereinheiten haben molekulare Massen zwischen 30 und 35 kDa (Banaszak & Bradshaw, 1975; Sundram et al., 1980).

In *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein Membran-assoziiertes Protein gefunden, das die Oxidation von Malat zu Oxalacetat katalysiert, die Malate:Quinon Oxidoreduktase (MQO). In *Pseudomonas aeruginosa* ist sie essentiell für das Wachstum auf Ethanol oder Acetat (Kretzschmar et al., 2002). MQO wurde bereits 1978 von Mizuno und Kageyama als Membran-assoziierte Malatdehydrogenase beschrieben.

Zellwände, die aus Maiswurzeln isoliert wurden, zeigten eine kovalent an sie gebundene NAD-spezifische Malatdehydrogenase – Aktivität. Das Enzym katalysiert eine schnelle Reduktion von Oxalacetat und eine langsamere Oxidation von Malat. Eine besonders hohe Aktivität der Zellwand-assoziierten Malatdehydrogenase wurde

in den stark wachsenden lateralen Wurzeln festgestellt (Hadži-Tašković Šukalović et al., 2011).

In *B. cinerea* und anderen phytopathogenen Pilzen scheint die Malatdehydrogenase außerdem eine Rolle bei der Pathogenität zu spielen (De Wit et al., 2009).

Die Malatdehydrogenase hat also verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle. Sie ist unter anderem notwendig für den Energiehaushalt und ist indirekt an der Entstehung bestimmter Aminosäuren beteiligt.

Bei einem Vergleich der beiden Proteinsequenzen „A2“ und „A3“ von *Mucor circinelloides* ergibt sich eine prozentuale Übereinstimmung von 54,6 % der Aminosäuren. Beide Sequenzen wurden durch die MALDI-TOF Analyse eindeutig als Malatdehydrogenasen identifiziert (Tab. 4.1), wobei es sich jedoch vermutlich um zwei verschiedene Isoenzyme der Malatdehydrogenase handelt. Beide sind hier im (+)- Kreuzungstyp hochreguliert.

5.4 „A4“: Acyl- CoA Dehydrogenase

Acyl- CoA Dehydrogenasen sind eine Gruppe mitochondrialer Flavoenzyme, die die α , β -Dehydrierung von Acyl-CoA Estern in der Fettsäure- β -Oxidation katalysieren, indem sie das Elektronentransfer- Flavoprotein (ETF) als physiologischen Elektronenakzeptor benutzen (He et al., 2007). Acyl-CoA Dehydrogenasen bestehen aus einer homologen Familie von FAD-abhängigen Enzymen, die die Konversion von Acyl-CoA Thioestern in die entsprechende trans- α , β -Enoyl-CoA katalysieren (Thorpe et al., 1979; Ghisla et al., 1984). Mitglieder dieser Familie teilen bedeutende strukturelle und biochemische Ähnlichkeiten, aber sie unterscheiden sich stark in ihrer Substratspezifität (Kim et al., 1993; Battaile et al., 2004). Acyl-CoA Dehydrogenasen sind an der β -Oxidation der „short-chain“, „medium-chain“, „long-chain“ und „very long-chain“ Fettsäuren beteiligt und am Katabolismus von Aminosäuren, darunter Leucin, Isoleucin, Valin und Lysin (Zhang et al., 2002, Nguyen et al., 2002; Besrat et al., 1969).

Es gibt mindestens neun bekannte Mitglieder der Acyl- CoA Dehydrogenasenfamilie, die im Aminosäurekatabolismus oder an der Fettsäureoxidation beteiligt sind. Im Verlauf der β -Oxidation kommt es zu zwei getrennten Dehydrierungsreaktionen. Zunächst werden Elektronen auf das Flavinadenindinucleotid (FAD) übertragen, in

einer zweiten werden Elektronen auf NAD^+ übertragen (aus: Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, 2009).

Defizite der Acyl-CoA Dehydrogenasen führen zu Fehlfunktionen der Fettsäureoxidation, was zu lebensbedrohlichen Episoden von fehlerhaften metabolischen Abläufen führt (Thorpe et al., 1995). Diese Defizite, besonders in der „Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase“ werden auch mit dem plötzlichen Kindstod assoziiert (Coates et al., 1992).

In Hefen läuft die β -Oxidation der Fettsäuren ausschließlich in Peroxisomen ab (Hiltunen et al., 2003). Die initiale Reaktion der β -Oxidation wird hier durch die Acyl-CoA Oxidase durchgeführt (Kunau et al., 1995). Eine genetische Studie an *Aspergillus nidulans* zeigte, dass die β -Oxidation sowohl in Peroxisomen als auch in den Mitochondrien abläuft, wobei die Mitochondrien spezifisch für die „short-chain“ Fettsäuren sind (Maggio-Hall and Keller, 2004). In den Mitochondrien geschieht der erste Schritt der β -Oxidation durch die Acyl-CoA Dehydrogenase (Kunau et al., 1995). Bei *N. crassa* wurde die β -Oxidation in Glyoxysomen entdeckt, hier ist ebenfalls die Acyl-CoA Dehydrogenase aktiv (Thieringer und Kunau, 1991).

Die Hochregulierung der Acyl-CoA Dehydrogenase, die an der β -Oxidation beteiligt ist, zeigt, dass in der Zelle ein erhöhter Energiebedarf herrscht. Durch diesen Vorgang entsteht vermehrt FADH_2 und $\text{NADH} + \text{H}^+$, Coenzyme, die an verschiedenen Oxidations- und Reduktionsreaktionen beteiligt sind (aus: Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, 2009).

Dies wäre in Übereinstimmung mit der Hochregulierung der Malatdehydrogenase, bei deren katalytischer Aktivität Malat aus Oxalacetat entsteht, wobei NAD^+ zu NADH oxidiert wird. Auch hier lässt sich die Hochregulierung der Acyl-CoA Dehydrogenase mit dem erhöhten Energiebedarf des (+)-Kreuzungstyps erklären.

Da Acyl-CoA Dehydrogenasen auch an der Synthetisierung von Aminosäuren beteiligt sind (Zhang et al., 2002, Nguyen et al., 2002; Besrat et al., 1969), kann man annehmen, dass sie auch hier im (+)-Kreuzungstyp bei einem erhöhten Aminosäurebedarf eine Rolle spielen.

5.5 „A7“: S- Adenosylmethionin Synthetase

S-Adenosylmethionin Synthetase (AdoMetS) katalysiert die Bildung von S-Adenosylmethionin (AdoMet) aus Methionin und ATP (Cantoni, 1953). AdoMet ist an

verschiedenen Zellfunktionen beteiligt. Es ist eine Methylonorgruppe und spielt eine Rolle in Transmethylierungsreaktionen (Chiang et al., 1996). DNA Methylierung hat regulatorische Effekte auf die DNA-Transkription und Chromosomenstruktur. Es wurde die These aufgestellt, dass AdoMet Transkriptionsfaktoren aktiviert oder direkt als Methylonor im biosynthetischen Stoffwechselweg der *Streptomyces* – Antibiotika wirkt (Zhang et al., 2008). AdoMet ist der Methylonor bei den meisten Methylierungsreaktionen, einschließlich Methylierung von Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Polysacchariden und ist daher wichtig im zellulären Stoffwechsel (Cantoni, 1977). Nach ATP ist es der häufigste Co-Faktor in metabolischen Reaktionen (Cantoni, 1977; Tabor and Tabor, 1984). Weil AdoMet für die DNA-Methylierung (Roberts und Selker, 1995) und die Synthese von Polyamiden, wie Spermine und Spermidine (Hamasaki-Katagiri et al., 1997) essentiell ist, ist es an der Kontrolle der Chromosomenstabilität und Genexpression beteiligt (Foss et al., 1993; Larsson et al., 1996).

AdoMet ist auch im biosynthetischen Stoffwechselweg von vielen sekundären Metaboliten involviert (Shimizu et al., 1989). Variationen im Zell- und Lebenszyklus der AdoMet Synthetase-Expression wurde in Hefen und Apicomplexa beobachtet (Slapeta et al., 2003; Brejning et al., 2002). Gene, die für S-Adenosylmethionin Synthetase kodieren, sind aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren isoliert worden und sind hochkonserviert (Mautino et al., 1996).

Cycloleucin ist ein Inhibitor der S-Adenosylmethionin Synthetase. Gibt man es zu Kulturen von *Mucor racemosus* verhindert es die Konversion vom Hefen- zum Hyphenstadium in der Gegenwart von Sauerstoff. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass erhöhte Level an S-Adenosylmethionin Synthetase notwendig sind für die Morphogenese von Hefe zu Hyphe (Garcia et al., 1984).

In einer Publikation von Hilti et al. (2000) wurde festgestellt, dass bei einer Reduzierung des für S-Adenosylmethionin Synthetase kodierende *sam1* Wachstum, Sporulation und Paarung bei *Schizosaccharomyces pombe* beeinträchtigt sind. Schweingruber et al. (1998) zeigten, dass Methionin die sexuelle Entwicklung bei *Schizosaccharomyces pombe* induziert und dass es den intrazellulären AdoMet Pool erhöht, was mit der Annahme übereinstimmt, dass eine niedrige AdoMet Produktion Paarung und Sporulation herabsetzt.

In diese Beobachtungen fügen sich die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese mit anschließender MALDI-TOF Untersuchung ein. Hierbei wurde im (-)- Kreuzungstyp von *Mucor mucedo* eine hochregulierte S-Adenosylmethionin Synthetase gefunden, die im (+)- Typ nicht vorhanden ist. Möglicherweise spielt sie auch bei *Mucor mucedo* eine Rolle bei der Paarung und ist darüber hinaus zuständig für die Bildung von AdoMet. AdoMet ist möglicherweise verantwortlich für die Methylierung von Transkriptionsfaktoren, die bei der Paarung eine Rolle spielen. Darauf deuten auch die Ergebnisse von Hilti et al., (2000) hin.

5.6 RAPD-PCR von *Mucor mucedo* und *Absidia glauca*

RAPD-PCR wurde zunächst für DNA-Fingerprints zur genetischen Analyse entwickelt (Williams et al., 1990). Später wurde dieses Verfahren jedoch weiter entwickelt und unter dem Namen RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) an die RNA-Fingerprintanalyse angepasst (Welsh et al., 1992).

Um DNA zu analysieren, deren Sequenz unbekannt ist, werden zufällige Primer von einer Länge von etwa 10 Basen verwendet. Unter den richtigen Bedingungen erhält man mehrere Banden unterschiedlicher Größe, Anzahl und Ausprägung. Deren Sequenz ist zwar weiterhin nicht bekannt, doch kann man durch einen Vergleich des Bandenmusters Unterschiede zwischen Individuen, Stämmen oder Spezies nachweisen (aus: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics; Spektrum, 6. Auflage, 2009).

Beim Vergleich der Kreuzungstypen (-) und (+) von *Mucor mucedo* zeigen sich deutliche Unterschiede im Bandenmuster (Abb. 4.54), bzw. sind nur 48,3% der Banden übereinstimmend (bei 7 getesteten Primern; Sequenzen siehe Kapitel 2.5.2). Ein Grund hierfür mag sein, dass die beiden Kreuzungstypen vermutlich nicht an der gleichen Stelle isoliert worden sind. Das „Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) " in Utrecht führt die beiden Kreuzungstypen unter den Nummern 109.16 für *Mucor mucedo* (-) und 144.24 für *Mucor mucedo* (+). Typ 109.16 wurde im Jahre 1916 von K. Saito isoliert. An welcher Stelle er die Probe entnommen hat, ist nicht in der Datenbank des CBS verzeichnet. Typ 144.24 wurde im Jahre 1924 von H. Burgeff isoliert, auch hier findet sich keine Ortsangabe in der CBS Datenbank. Es ist daher anzunehmen, dass beide Typen an verschiedenen Orten isoliert worden sind. Dies würde eine Erklärung für die großen Unterschiede im Bandenmuster abgeben,

da anzunehmen ist, dass sich diese beiden Kreuzungstypen über einen längeren Zeitraum nicht miteinander verpaart haben. Dadurch konnten sich Mutationen im Genom ansammeln, die nicht durch einen Genaustausch an den jeweiligen komplementären Kreuzungstyp weitergegeben werden konnten.

Um diese Theorie für die Abweichungen im Genom zu untermauern, müssten allerdings komplementäre Stränge getestet werden, die beide von einer identischen Stelle isoliert worden sind. Ergeben sich hier jedoch auch signifikante Unterschiede im Genom, wird die Theorie hinfällig, da man von einer regelmäßigen Kreuzung von Partnern ausgehen kann, die im gleichen Habitat existieren.

Eine weitere Erklärung wäre die, dass es sich um einen Geschlechts - Dimorphismus handelt. Die hier verwendeten *Mucor mucedo* Kreuzungstypen sind bereits in ihrem Phänotyp leicht unterschiedlich, der (-)- Typ zeigt mehr Verzweigungen im Bodenmyzel, wobei der Abstand zwischen den Verzweigungen kürzer ist als im (+) Typ. Der (-)- Typ produziert Sporangioophoren, die länger sind als die des (+)- Typs und schneller wachsen.

Jedoch ließen sich bei der Proteomanalyse durch 2D-Gele nur sehr geringe Unterschiede in der Expression der Gene feststellen. Bei den zytoplasmatischen Proteinen wurden insgesamt 7-10 unterschiedliche Spots gefunden (vergl. Abb. 4.2 und 4.3), bei den Zellwand-assoziierten Proteinen 12. Es lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob diese Unterschiede im Proteom ausreichen, um die Unterschiede der in der RAPD-PCR gefundenen Banden zu erklären. Auch ist es unwahrscheinlich, dass alle Unterschiede in der Genexpression durch die 2D-Gele entdeckt wurden, da es vermutlich Gene gibt, die in geringeren Mengen transkribiert und translatiert werden und daher auf den 2D-Gelen nicht zu sehen sind.

Unklar ist auch, an welcher Stelle im Genom die Primer an die DNA binden. Es können sowohl Bereiche im Exon eines Gens sein, als auch in nicht-kodierender, repetitiver DNA. Da die tatsächlichen Unterschiede im Proteom jedoch sehr gering sind, ist anzunehmen, dass die Primer, bzw. die Mehrzahl davon, Stellen im Genom amplifizieren, die nicht translatiert werden.

Um all diese Theorien zu prüfen, wäre es jedoch notwendig, weitere *Mucor mucedo* (-) und (+) Stämme zu testen, jedoch solche, die aus dem gleichen Umfeld isoliert wurden.

Absidia glauca ist ein Vertreter der Mucoraceen der Klasse der Zygomyceten (Teepe et al., 1988). Die Ergebnisse der RAPD-PCR von *Absidia glauca* (Ag), die als Vergleich hinzugezogen worden sind, zeigen ein gänzlich anderes Bild (Abb. 4.55). Hier sind 89,1% der Banden übereinstimmend. Die (-)- und (+)- Kreuzungstypen stammen im Gegensatz zu den Mm-Kreuzungstypen aus dem gleichen Habitat. In der Datenbank des CBS wird angegeben, dass der Stamm Ag (-) 101.48 bei Winkel im Rheingau, nahe des Rheins isoliert wurde, der Stamm Ag (+) 100.48 ebenso. Beide wurden von H. Burgeff isoliert und im Jahre 1948 an das CBS übergeben. Hier liegt der Fall also ein wenig anders, denn beide Kreuzungstypen sind an der gleichen Stelle gefunden worden.

Daraus lassen sich vermutlich die größeren Übereinstimmungen im Bandenmuster erklären, denn da die Kreuzungstypen am gleichen Ort isoliert wurden, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass genetisches Material regelmäßig ausgetauscht wurde und eventuelle Mutationen an den komplementären Stamm weitergegeben wurden. Daher sind die beobachteten Unterschiede der (-) und (+) Typen im *Mucor mucedo* Genom vermutlich auf die verschiedenen Standorte zurück zu führen und nicht auf einen Geschlechts – Dimorphismus.

5.7 DNA-Sequenzvergleiche mit Dikarya und Mucoromycotina

Die Abbildungen 4.48 – 4.53 zeigen deutlich, dass es große Unterschiede in den DNA-Sequenzen zwischen *Mucor mucedo* und Asco- Basidio- und Zygomyceten gibt. Daher ist es nachvollziehbar, dass sich die Aminosäuresequenzen ebenfalls unterscheiden. Durch diese erhebliche Differenz der Sequenzen auch innerhalb der Zygomyceten ist es zu erklären, dass sich in der MALDI-TOF Analyse bei den Zellwand– assoziierten Proteinen keine signifikanten Ergebnisse erzielen ließen. Diese weisen kaum konservierte Regionen auf, so dass es bei einem MASCOT – Abgleich der Proteinmassen mit den Proteinsequenzen schwierig ist, Übereinstimmungen mit weiteren Zygomyceten zu finden. Die zytoplasmatischen Proteine hingegen weisen innerhalb der Zygomyceten Regionen auf, die auch auf Genomebene konserviert sind. Teilweise sind diese Regionen auch in den Asco- und Basidiomyceten vorhanden (Abb. 4.51). So erscheint es plausibel, dass auch die Proteinsequenzen dieser Gene hochkonserviert sind und sich für einen MASCOT- Abgleich mit den Massen der *Mucor mucedo* – Proteine eignen.

5.8 Chitosanbildung während der Zygosporientstehung

Chitin ist ein β -(1,4)- verankertes Polymer von N-Acetylglucosamin, eines der häufigsten Biopolymere in der Natur. Es kommt in verschiedenen Organismen vor, von Pilzen bis zu Insekten und Crustaceen (Cohen, 1987). Chitin ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Pilz- Zellwand und der Septen. Allerdings macht Chitin nur 1-2 % des Trockengewichts von Hefen aus (Klis, 1994), jedoch bis zu 40 % des Trockengewichts in filamentösen Pilzen (Bartnicki-Garcia et al., 1969).

Chitosan, die deacetylierte Form von Chitin, ist ebenso ein wichtiger Bestandteil der Zellwand in unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus verschiedener Pilze (Christodoulidou et al., 1996). Dennoch ist noch nicht geklärt, wie weit verbreitet Chitosan unter den Pilzen ist. Chitosan wird nicht direkt synthetisiert, sondern durch sekretierte Enzyme, die Chitindeacetylasen, produziert (Araki et al, 1975). Chitosan ist ein Polykation, das löslicher ist als das neutral geladene Chitin. Die Mucorales produzieren während des vegetativen Wachstums Chitosan (Orlowski, 1991), wohingegen *Saccharomyces cerevisiae* nur während der Sporulation Chitosan erzeugt (Christodoulidou et al., 1996). Chitosan bildet hier eine Schicht an der Zellwand der Ascospore und ist vermutlich auch zwischen den einzelnen Sporen vorhanden (Coluccio et al., 2004). *S. cerevisiae* hat zwei Chitindeacetylasen, CDA1 und CDA2, die nur während der Sporulation transkribiert werden (Christodoulidou et al., 1996) und für die Lebensfähigkeit nicht notwendig sind. Die Ausschaltung beider Gene erzeugt Sporen, die empfindlicher gegenüber Schäden an der Zellwand sind (Christodoulidou et al., 1999). Die Beteiligung dieses Enzyms in Pflanzen-Pathogen Interaktionen ist auch beobachtet worden (Tsigos et al., 1995). Die Isolierung des ersten CDA-codierenden Gens von *Mucor rouxii* zeigte eine große Ähnlichkeit mit den rhizobiellen nodB Proteinen, woraus man eine funktionelle Homologie dieser evolutionär entfernt verwandten Proteine ableiten kann (Kafetzopoulos D. et al., 1993).

Vor diesem Hintergrund lassen sich die Ergebnisse der Abbildungen 4.58 und 4.59 erklären. Es scheint notwendig zu sein, für die Erkennung, bzw. Verschmelzung mit dem komplementären Kreuzungspartner Chitosan zu erzeugen. Daher ist zunächst bei einem Kreuzungstyp (welcher, ist noch unbekannt) eine Zunahme an Chitosan in der Gametangie zu beobachten. Nachdem jedoch das Zygosporienstadium erreicht ist, ist in beiden Partnern eine ausgeprägte Chitosan- Färbung nachzuweisen.

Möglicherweise spielt auch hier, wie bei den Ascosporen von *S. cerevisiae* beobachtet, Chitosan eine Rolle beim Schutz der Zellwand der Zygosporien.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die, dass Chitosan überhaupt notwendig ist für die Verschmelzung der beiden Partner. Da bei Pflanzen-Pathogen Interaktionen ein mit der Chitinacetylase verwandtes Protein beobachtet worden ist, scheint es auch bei *Mucor mucedo* plausibel, dass bei einer Interaktion beider Kreuzungspartner die Deacetylierung von Chitin essentiell für den Verschmelzungsvorgang ist. Dadurch ließe sich auch die relative Abwesenheit von Chitosan in den Sporangien erklären, da diese doch ebenso von einem Schutz der Zellwände durch Chitosan profitieren würden. Dennoch ist hier keine erhöhte Ausprägung von Chitosan festgestellt worden (vergl. Abb. 4.58 und 4.59). Um diese Theorie zu beweisen, müssen zunächst Chitinacetylases von *Mucor mucedo* charakterisiert und deren Aktivität in einem Western Blot in verschiedenen Stadien von Einzel- und Kreuzkulturen nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Auf genomischer Ebene zeigen sich zwischen den beiden Kreuzungstypen (-) und (+) von *Mucor mucedo* erhebliche Differenzen (Abb. 4.54). Auf Proteinebene lassen sich jedoch nur wenige Unterschiede erkennen (Abb. 4.1 – 4.3).

Die durch die MALDI-TOF Analyse gefundenen Proteinsequenzen sind ein guter Hinweis darauf, dass vor allem im (-)- Kreuzungstyp häufig Membran- gebundene Proteine aktiviert werden. Die Aktivierung des Zitronensäurezyklus und der β -Oxidation im (+)- Kreuzungstyp lässt darauf schließen, dass er einen erhöhten Energiebedarf hat.

Die DNA-Sequenzergebnisse der klonierten Fragmente von *Mucor mucedo* zeigen im Vergleich mit Gensequenzen von Basidiomyceten, Ascomyceten und weiteren Zygomyceten (Abb. 4.48 – 4.53), dass sich *Mucor mucedo* erheblich von anderen Pilzen unterscheidet. Auch bei einem Sequenzvergleich mit den Zygomyceten *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeenanus* und *Rhizopus oryzae* wird deutlich, dass diese doch große Unterschiede aufweisen, so dass es nachvollziehbar ist, dass auch auf Proteinebene Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu finden sind. Dies wiederum zeigt, dass es durch die MALDI-TOF Analyse schwierig ist, eindeutige Ergebnisse zu erlangen. Allerdings scheint sich dies auf die Zellwand – assoziierten Proteine zu beschränken, die häufig posttranslationale Modifikationen aufweisen, durch die das MALDI-TOF Verfahren zusätzlich erschwert wird. Bei den zytoplasmatischen Proteinen ließen sich 4 Sequenzen eindeutig bestimmen, da diese in ihren Aminosäuresequenzen hoch konserviert sind.

Die Ergebnisse der Chitosanfärbungen deuten darauf hin, dass bei der Verschmelzung beider Partner Chitosan unerlässlich ist. Es muss untersucht werden, wie viele und welche Chitindeacetylasen in *Mucor mucedo* vorhanden sind, um im Anschluss daran einen Doppel – oder Mehrfach- Knock-out zu erzeugen, um den Phänotyp beschreiben zu können. Möglicherweise sind die beiden Partner dann nicht mehr in der Lage, Zygosporien zu bilden.

7 Abstract

At the genomic level several differences between the *Mucor mucedo* mating types (-) and (+) are visible (Abb. 4.54). At the protein level, however, only few differences are measurable (Abb. 4.1 – 4.3).

Protein sequences found by MALDI-TOF analysis are an indication that especially in the (-)- mating type many membrane – associated proteins are activated. The activation of the citric acid cycle and the fatty acid β -oxidation in the (+)- mating type are evidence to suggest that there is an elevated energy demand.

DNA sequences results of the cloned fragments of *Mucor mucedo* show in comparison to gene sequences of basidiomycetes, ascomycetes and other zygomycetes (Abb. 4.48-4.53) that *Mucor mucedo* differs considerably from other fungi. A sequence comparison with the zygomycetes *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* and *Rhizopus oryzae* shows that they have significant differences which make it conceivable that there are considerable differences in the amino acid sequences at the protein level as well. This shows that it is difficult to receive reliable results in the MALDI-TOF analysis. Nevertheless this only seems to concern the cell wall associated proteins which very often have posttranslational modifications. These impede the MALDI-TOF method. Within the cytoplasmatic proteins four sequences were unambiguously identifiable since these amino acid sequences are highly conserved.

The chitosan staining results indicate that chitosan is necessary for the fusion of both mating partners. It has to be evaluated how many and which chitin deacetylases are present in *Mucor mucedo*. Subsequently double- or multiple knock-outs should be constructed to describe the phenotype. It is possible that the respective mating partners will then not be able to form zygospores.

8 Literatur

- Albenne C., Canut H., Boudart G., Zhang Y., San Clemente H. Pont-Lezica R., Jament E., (2009) Plant cell wall proteomics: mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Molecular Plant* **5**:977-999
- Albrecht A. et al., (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:68-694
- Alexopoulos C.J. (1962) Introductory mycology, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Araki Y., Ito E., (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry* **55**:71-78
- Aruchandran A., Cerritelli S. M., Narimatsu S. K., Itaya M., Shin D. Y., Shimada Y., Crouch R. J. (2000) The absence of ribonuclease H1 or H alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methansulphonate: implication for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes Cells*, **5**:789-802.
- Baker L. G., Specht C. A., Donlin M. J., Lodge J.K. (2007) Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, Vol **6**(5):855-867
- Banaszak L.J., Bradshaw R.A. (1975) Malate dehydrogenase. In: Boyer PDE, ed. *The enzymes 3d ed*. New York: Academic Press.
- Bar-Peled M., Griffith C. L., Doering T., L. (2001) Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **98**(21):12003-12008
- Bartnicki-Garcia S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* **22**:87-108
- Bartnicki-Garcia, S., Lippman E., (1969) Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* **165**:302-304
- Battaile K.P., Nguyen T.V., Vockley J., Kim J.J. (2004) Structures of isobutyryl-CoA dehydrogenase and enzyme product complex: comparison with

- isovaleryl- and short-chain acyl-CoA dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:16526-34
- Besrat A., Polan C.E., Henderson L.M. (1969) Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight. *The Journal of Biological Chemistry* **244**:1461-1467
- Betz R., Duntze W., Manney T.R. (1978) Mating-factor-mediated sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **4**:107-110
- Betz R., Manney T.R., Duntze W. (1981) Hormonal control of gametogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gamete Research* **4**:571-584
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**:1513-1523
- Blin et al., (1975) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **3**(9): 2303 - 2308
- Blomberg A., Adler L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology* **33**:122-145
- Brejning J., Jespersen L. (2002) Protein expression during lagphase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, **75**(1-2):27-38
- Bu'Lock , J.D., Jones B.E., Quarrie S.A., Winskill N. (1973) The biochemical basis of sexuality in *Mucorales*. *Naturwissenschaften* **60**:550-551
- Bu'Lock, J.D. (1976) The Filamentous Fungi, vol. 2 , 1st ed. (Smith, J.E. and Berry, D.R. eds) pp. 345 – 368, Edward Arnold, London
- Burgeff H. (1924) Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen I. *Botanische Abhandlungen* **4**:1-135
- Cantoni G.L. (1953) S-Adenosylmethionine, a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosintriphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* **204**:403-416
- Cantoni G.L. (1953) S-Adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* **204**(1):403-416
- Cantoni G.L. (1977) The biochemistry of adenosylmethionine, 1st ed. In: Salvatore F., Vorek E., Zappia V., Williams-Ashman H.G., Schlenk F. (eds). Columbia University Press: New York, pp. 557-577

- Cappellaro C., Hauser K., Mrsa V., Watzele M., Watzele G., Gruber C., Tanner W. (1991) *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *EMBO Journal*, **10**:4081-4088
- Carlile M. J., Watkinson S. C., Gooday G. W., Academic Press, The Fungi, 2nd ed., 2001
- Chiang P.K., Gordon R.K., Tal J., Zeng G.C., Doctor B.P., Pardhasaradhi K., McCann P.P. (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal*, **10**(4):471-480
- Christodoulidou A., Bouriotis V., Thireos G., (1996) Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**:31420-31425
- Christodoulidou A., Brizab P., Ellingerc A., Bouriotis V. (1999) Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS* **460**:275-279
- Coates P.M., Tanaka K. (1992) *New developments in fatty acid oxidation*. 1st ed. Wiley-Liss, New York, 271-581
- Cohen E., (1987) Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annual Review of Entomology* **32**:71-93
- Cole K.D. (1991) Purification of plasmid and high molecular mass DNA using PEG salt two-phase extraction. *Biotechniques*. **11**(1):18, 20, 22-4
- Coluccio A., Neiman A.M. (2004) Interspore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall. *Microbiology* **150**:3189-3196
- Cooke F.T., Dove S.K., McEwen R.K., Painter G., Holmes A.B., Hall M.N., Mitchell R.H., Parker P.J. (1998) The stress-activated phosphatidylinositol 3 phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. *Current Biology* **8**:1219-1222.
- De Groot P.W.J. et al., (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesions. *Eukaryotic Cell* **3**:955-965
- De Wit P.J., Mehrabi R., Van den Burg H.A., Stergiopoulos I. (2009) Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* **10**(6):745- 747
- Delauny J., Steward G., Iolascon A. (1999) Hereditary dehydrated and overhydrated stomatocytosis: recent advances. *Curr Opin Hematol.* **6**:110-114.

- Douglas L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* **11**:30-36
- Dranginis A.M. et al., (2007) A biochemical guide to yeast adhesions: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:282-294
- Eder P.S., Walder R.Y., (1993) Substrate specificity of human RNase H1 and its role in excision repair of ribose residues misincorporated in DNA. *Biochemie*, **75**: 123-126
- Fehrenbacher G., Perry K., Thorner J. (1978) Cell-cell recognition in *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of mating-specific adhesion. *Journal of Bacteriology*, **134**:893-901
- Fengel D., Wegener G. (1979) Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its application to rapid wood and pulp analysis. In RM Brown Jr., L. Jurasek, eds, Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis. *Advances in Chemistry* Series No. 181. ACS, Appleton, WI, pp 145-158
- Feofilova, E.P., Pisarevskaya, I.V., Tolstikova, G.V. and Ushanova, A.E. (1981) Cell wall composition of the fungus *Absidia coerulea*. *Mikrobiologiya* **50**:829-837
- Foss H.M., Roberts C.J., Claeys K.M., Selker E.U. (1993) Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* **262**:1737-1741
- Garcia J.R., Sypherd P.S. (1984) S-adenosylmethionine and morphogenesis in *Mucor racemosus*. *Current Microbiology* **10**:111-116
- Galgoczy D.J., Cassidy-Stone A., Llinas M., O'Rourke S.M., Herskowitz I., DeRisi J.L., Johnson A.D., (2004) Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **101**:18069-18074
- Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1426**:227-237
- Ghisla S. (1984) Flavins and flavoproteins Proc Intern Symp 8th. Bray R., Engel P.C., Mayhew S.G., editors. de Gruyter; Berlin; New York: pp.385-401

- Georghe, M. et al (1997) Optimized alcoholic deacetylation of N-acetyl-blocked polypeptides for subsequent Edman degradation. *Analytical Biochemistry* **254**:119-125
- Gooday, G. W. (1973) Differentiation in the Mucorales. 1st ed. In Microbial Differentiation. (J. M. Ashworth & J. E. Smith, eds.) *Cambridge University Press, Cambridge*. pp. 269 – 294
- Gorg A., Weiss, W., Dunn M.J., (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**:2665-2685
- Goward C.R., Nicholls D.J. (1994) Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis. *Protein Science*, **3**:1883-1888
- Green J., Fricke B., Chetty M., von Düring M., Preston G., Steward G. (2004) Eukarotic and prokaryotic stomatins: the proteolytic link. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **32**:411-422
- Hadži-Tašković Šukalović et al. (2011) Cell wall-associated malate dehydrogenase activity from maize roots. *Plant Science* October 2011, **181**(4):465-470
- Hamasaki-Katagiri N. Tabor C.W., Tabor H. (1997) Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of SPE3 gene (spermidine synthase). *Gene* **187**:35-43
- Hänfler J., Teepe H., Weigel C., Kruff V., Lurz R., Wöstemeyer J. (1992) Circular extrachromosomal DNA codes for surface protein in the (+) mating type of the zygomycete *Absidia glauca*. *Current Genetics* **22**:319-325
- Hart C. et al. (1990) A replication-deficient HIV-1 DNA used for quantitation of the polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Research* **18**:4029-4030
- Heda G.D. (2003) Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Provided through: The European Working Group on CFTR Expression
- Heitman J. (2007) Sex in fungi: Molecular determination and evolutionary implications. In: *ASM Press*. 1st ed.
- Hiebl-Dirschmied C., Adolf G., Prohaska R., (1991) Isolation and partial characterization of the human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1065**:195-202.
- Hilti N., Gräub R., Jörg M., Arnold P., Schweingruber A.-M., Schweingruber M.E. (2000) Gene sam1 encoding adenosylmethionine synthetase: effects of its expression in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **16**:1-10

- Hiltunen J.K., Mursula A.M., Rottensteiner H., Wierenga R.K. (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:35-64
- Ip Y. T., Davis R. J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* **10**(2):205-219
- Jones, B.E. and Godday, G.W. (1978) An immunofluorescent investigation of the zygophore surface of mucorales. *FEMS Microbiology Letters* **4**:181 – 184
- Jones Jr. S.K., Bennett R.J. (2011) Fungal mating pheromones : choreographing the dating game. *Fungal Genetics and Biology* **48**:668-676
- Kafetzopoulos D., Thireos G., Vournakis N.J., Bouriotis V. (1993) The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **90**(17):8005-8008
- Kellogg D.E., Sninsky J.J., Kwok S. (1990) Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **189**:202
- Kim J.J., Wang M., Paschke R., Djordjevic S., Bennett D.W., Vockley J. (1994) Flavins and flavoproteins 1993. Yagi K., editor. Walter deGruyter; New York: pp.273-282
- Klein-Lankhorst R.M., Vermunt A., Weide R., Liharska T., Zabel P. (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L.esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics* **83**:108-114
- Klis F.M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**:851-869
- Klis F.M. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185-202
- Kobe B., Deisenhofer J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences* **19**(10):415-421
- Kobe B., Kajava A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* **11**(6):725-732
- Kretzschmar U., Rückert A., Jeoung J.-H., Görisch H. (2002) Malate:quinone oxidoreductase is essential for growth on ethanol or acetate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**:3839-3847

- Kunau W.H., Dommes V., Schulz H. (1995) Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in Lipid Research* **34**:267-342
- Larson J., Zhang J., Ramsuson-Lestander A. (1996) Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene encoding S-adenosyl-methionine synthetase suppress position –effect variegation. *Genetics* **143**:887-896
- Lee, S.C., Ni M., Li W., Shertz C., Heitman J., (2010) The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**(2):298-340
- Li F. et al., (2007) Eap1p, an adhesion that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryotic Cell* **6**:931-939
- Maggio-Hall L.A., Keller N.P. (2004) Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **54**:1173-1185
- Mandel M., Higa A., (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**(1):159-62
- Mautino M.R., Barra J.L., Rosa A.L. (1996b) Cloning and sequence of the *Ascobolus immersus* S-adenosyl-L-methionine synthetase-encoding gene. *Gene* **170**:155-156
- McIlvaine T.C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *The Journal of Biological Chemistry* **49**(1):183-186
- Mesland D.A., Huisman J.G., van den Ende H. (1974) Volatile sexual hormones in *Mucor mucedo*. *Journal of General Microbiology* **80**: 111-117.
- Minárik P., Tomášková N., Kollárová M., Antalík M. (2002) Malate dehydrogenases -structure and function. *General Physiology and Biophysics* **21**(3):257-65.
- Mizuno T., Kageyama M. (1978) Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biochemistry* **84**:179-191
- Neer E. J., Schmidt C. J., Nambudripad R., Smith T. F., (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**(6495):297-300
- Nguyen T.V., Andresen B.S., Corydon T.J., Ghisla S., Abd-El Razik N., Mohsen A.W., Cederbaum S.D., Roe D.S., Roe C.R., Lench N.J. Vockley (2002) Identification of isobutyryl-CoA dehydrogenase and its deficiency in humans. *Molecular Genetics and Metabolism* **77**:68-79

- Nombela C. et al., (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends in Microbiology* **14**:15-21
- Orlowski M., (1991) Mucor dimorphism. *Microbiological Reviews*, **55**:234-258
- Petiot A., Faure J., Stenmark H., Gruenberg J. (2003) PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *The Journal of Cell Biology* **162**(6):971-979
- Phan Q.T. et al., (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasion that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLOS Biology* **5**:64
- Prussak C. et al., (1989) Peptide production from proteins separated by sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **178**:233-238
- Qiu J.Z., Qian Y., Frank P., Wintersberger U., Shen B. H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* RNase H(35) functions in RNA primer removal during lagging-strand DNA synthesis, most efficiently in cooperation with Rad27 nuclease. *Molecular and Cellular Biology* **19**:8361-8371.
- Raudaskoski M. (1998) The relationship between B mating type genes and nuclear migration in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology* **24**:207-227
- Raudaskoski M., Kothe E., (2010) Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryotic Cell* **9**(6):847-859
- Roberts C.J., Selker E.U. (1995) Mutations affecting the biosynthesis of S-adenosylmethionine cause reduction of DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research* **23**:4818-4826
- Schäfer A., Wöstemeyer J. (1992) New nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research* **20**(16): 4375-4394
- Schachtschabel D., Schimek C., Wöstemeyer J., Boland W., (2005). Biological activity of trisporoids and trisporoid analogues in *Mucor mucedo* (-). *Phytochemistry*; **66**(11):1358-65.
- Schäfer A., Kerksen D., Veenhuis M., Kunau W-H., Schliebs W., (2004) Functional similarity between the peroxisomal PTS2 receptor binding protein Pex18p and the N-terminal half of the PTS1 receptor pex5p. *Molecular and Cellular Biology* **24**(20); 8895-8906

- Scharf S.J., Hirn G.T., Erlich (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*; **233**:1076-78
- Schimek C., Kleppe K., Saleem A., Voigt K., Burmester A., Wöstemeyer J., (2003). Sexual reactions in *Mortierellales* are mediated by the trisporic acid system. *Mycological Research* **107**(6): 736-747
- Schimek C., Petzold A., Schultze K., Wetzel J., Wolschendorf F., Burmester A., Wöstemeyer J., (2005) 4-Dihydromethyltrisporate dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway in *Mucor mucedo*, is constitutively transcribed but its activity is differently regulated in (+) and (-) mating types. *Fungal Genetics and Biology* **42**:805-812
- Schimek C., Wöstemeyer J., (2006) Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycota and Zygomycota, and in the Oomycota. The Mycota, Volume 1, Springer Berlin Heidelberg, pp:215-231
- Schimek C., Wöstemeyer J., (2009) Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochemistry*. *Phytochemistry* **70**(15-16):1867-1875
- Schweingruber A.-M., Hilti N., Edenharter E., Schweingruber M.E. (1998) Methionine induces sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* via a *ste11*-dependent signaling pathway. *Journal of Bacteriology* **180**:6338-6341
- Seernivasaprasad S., Eastwoo D.C., Browning N., Lewis S.M.J., Burton K.S. (2005) Differential expression of a putative riboflavin-aldehyde-forming enzyme (raf) gene during development and post-harvest storage and in different tissue of the sporophore in *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**(4):470-476
- Shimizu Y., Gupta ., Masuda K., Maranda L., Walker C.K., Wang R. (1989) Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. *Pure Applied Chemistry* **61**(3):513-516
- Slapeta J., Stejskal F., Keithly J.S. (2003) Characterization of S-Adenosylmethionine synthetase in *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiological Letters* **225**(2):271-277
- Sundaram T.K., Wright I.P., Wilkinson A.E. (1980) Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino

- acid composition, immunochemical homology, and catalytic activity. *Biochemistry* **19**:2017-2022
- Tabor C.W., Tabor H. (1984) Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology* **56**:251 -282
- Teepe H., Böttge J.-A., Wöstemeyer J. (1988) Isolation and electrophoretic analysis of surface proteins of the zygomycete *Absidia glauca*. *FEBS letters* **234**(1): 100-106
- Thieringer R. Kunau W.H. (1991) The beta-oxidation system in catalase-free microbodies of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Purification of a multifunctional protein possessing 2-enoyl-CoA hydratase, L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activities. *The Journal of Biological Chemistry* **266**:13110-13117
- Thorpe C., Matthews R.G., Williams C.H. Jr. (1979) Acyl-coenzyme A dehydrogenase from pig kidney. Purification and properties. *Biochemistry* **18**:331-337
- Thorpe C., Kim J.-J.P. (1995) Structure and mechanism of action of the Acyl-CoA dehydrogenases. *The FASEB Journal*. **9**:718-725
- Tsigos I., Bouriotis V. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:26286-26291
- Urban C. et al. (2003) Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Letters* **544**:228-235
- Vallon, Wollman (1995) Mutations affecting O-glycosylation in *Chlamydomonas reinhardtii* cause delayed cell wall degradation and sex-limited sterility. *Plant Physiology* **108**:703-712
- Van Dam T.J.P., Bos J.L., Snel B., (2011) Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Landesbioscience* **2**:4-16
- Van den Ende H., (1968) Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *Journal of Bacteriology* **96**:1298-1303.

- Van den Ende H., Werkman B. A., van den Briel M. L. (1972) Trisporic acid synthesis in mated cultures of the fungus *Blakeslea trispora*. *Archives of Microbiology* **86**:175-184
- Van der Vlugt-Bergmans C.J.B., Brandwagt B.F., Van't Klooster J.W., Wagemakers C.A.M., Van Kan J.A.L. (1993) genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **97**(10):1193-1200
- Vogelstein B., Gillespie D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **76**(2): 615-619
- Wanders R.J. (2004) Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* **83**(1-2):16-27
- Welsh J., (1992) RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Nucleic Acids Research* **20**, 4965-4970.
- Werkman T., & van den Ende H., (1973) Trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. Interaction between plus and minus mating types. *Archiv für Mikrobiologie* **90**:365-374
- Wetzel J., Scheibner O., Burmester A., Schimek C., Wöstemeyer J., 4-Dihydrotrisporin- Dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway of *Mucor mucedo*: Purification, cloning of the corresponding gene and developmental expression. *Eukaryotic Cell*, **8**(1):88-95
- Whittaker R. H., (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**:150-160
- Williams J.G. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.
- Wojciechowicz D., Lu C.-F., Kurjan J., Lipke P. (1993) Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Molecular and Cellular Biology* **13**:2554-2563
- Wöstemeyer A., Teepe H., Wöstemeyer J., (1990) Genetic interactions in somatic inter-mating type hybrids of the zygomycete *Absidia glauca*. *Current Genetics* **17**:163-168
- Wöstemeyer J., 1985, Strain-dependent variation in ribosomal DNA arrangement in *Absidia glauca*. *European Journal of Biochemistry* **146**:443 – 448

- Wöstemeyer J., Wöstemeyer A., Burmester A., Czempinski K., (1995) Relationships between sexual processes and parasitic interactions in the host – pathogen system *Absidia glauca* – *Parasitella parasitica*. *Canadian Journal of Botany* **73**:243-250
- Wöstemeyer J., Schimek C., (2007) Trisporic acid and mating in zygomycetes. In J. Heitman, J. W. Kronstad, J.W. Taylor, and L. Casselton (ed.), Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. ASM Press, Washington, DC. p.431-443
- Wywiał E., Singh S. M. (2010) Identification and structural characterization of FYVE domain-containing proteins of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* August 2; **10**:157
- Yanagishima N., Yoshida K. (1981) Sexual interactions in *Saccharomyces cerevisiae* with special reference to the regulation of sexual agglutinability. 1st ed. In O'Day, D.H. and Horgan, P.A. (eds). Sexual interactions in eukaryotic microbes. *Academic Press, New York*, pp.261-295.
- You Z., Gao X., Ho M., Borthakur D., (1998) A stomatin-like protein encoded by the slp gene of *Rhizobium etli* is required for nodulation competitiveness on the common bean. *Microbiology SGM.* **144**(9):2619-2627.
- Zeng Y., Bannon G., Thomas V.H., Rice K., Drake R., Elbein A. (1997) Purification and specificity of β 1,2-xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:31340-31347
- Zhang J., Zhang W., Zou D., Chen G., Wan T., Zhang M., Cao X. (2002) Cloning and functional characterization of ACAD-9, a novel member of human acyl-CoA dehydrogenase family. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **297**:1033-42
- Zhang X., Fen M., Shi X., Bai L., Zhou P. (2008) Overexpression of yeast S-adenosylmethionine synthetase metK in *Streptomyces actuosus* leads to increased production of nosiheptide. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**(6):991-995

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- der Graduiertenschule Jena School for Microbial Communication für die Bereitstellung eines Stipendiums
- Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer für die Betreuung während meiner Doktorarbeit
- Dr. Jana Wetzel für die wertvolle und hilfreiche Unterstützung im Labor
- Dr. Olaf Kniemeyer und Maria Pötsch vom Hans Knöll – Institut Jena für die MALDI-TOF Analyse meiner Proteine
- Prof. Dr. Theißen für die Zweitbetreuung meiner Doktorarbeit
- der Aberdeen Fungal Group, University of Aberdeen, UK, hierbei besonders Prof. PhD Neil A. R. Gow, Dr. Carol Munro und Keunsook Lee für ihre Beratung und Hinweisen zu Zellwandglykosylierungen und der Durchführung der HPLC
- allen aus der Arbeitsgruppe Wöstemeyer, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen
- meinen Eltern, Bruder und Freunden, die immer ein offenes Ohr für mein Gejammer hatten!

10 Veröffentlichungen

10. 1 Vortrag

10/ 2009: **JSMC/ILRS Symposium:** “Molecular analysis of sexual communication in the zygomycetous fungus *Mucor mucedo*”

10.2 Poster

12/2008 **1st JSMC Symposium:** “Molecular analysis of sexual communication in the zygomycetous fungus *Mucor mucedo*”

09 + 10/2010 **MiCom:** “Molecular analysis of sexual communication in the zygomycetous fungus *Mucor mucedo*”

04/2011 **VAAM:** “Molecular analysis of sexual communication in the zygomycetous fungus *Mucor mucedo*”

11 Curriculum vitae

11.1 Persönliche Angaben

Name	Yvonne Rudigier
Geburtsdatum	11.01.1980
Geburtsort	Offenburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1990 – 1999	Schiller – Gymnasium Offenburg
1986 – 1990	Grund – und Hauptschule Zell – Weierbach

Studium

10/1999 – 12/2005	Biologiestudium an der Universität Konstanz
08/2002 – 05/2003	Bioloiestudium an der Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA

Promotion

07/2008 – dato	Doktorarbeit an der Friedrich Schiller – Universität Jena, Institut für Allgemeine Mikrobiologie und Mikrobengenetik
04/2010 – 07/2010	3-monatiger Forschungsaufenthalt an der University of Aberdeen (Aberdeen Fungal Group) im Rahmen meiner Doktorarbeit

Berufliche Erfahrung

11/2011 – dato	QA Managerin bei Hoffmann – La Roche, Schweiz
09/2006 – 06/2008	Qualitätssicherungsinspektorin bei RCC Ltd. (heute Harlan Laboratories Ltd.), Itingen, Schweiz
01/2006 – 03/2006	Hilfswissenschaftliche Angestellte an der Universität Konstanz

12 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Birsfelden, den 07. Februar 2014

Yvonne Rudigier

Erklärung:

Ich erkläre,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist;

dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen worden sind;

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben (siehe Danksagung);

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe;

dass ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Birsfelden, den 07. Februar, 2014

Yvonne Rudigier